



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11) 
1-0020615

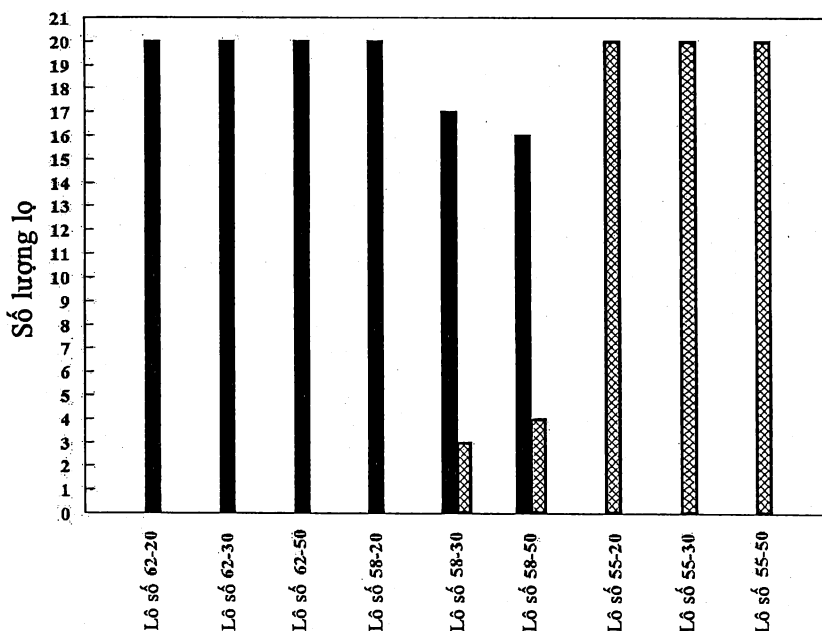
(51)⁷ **A61K 9/19, C07K 14/785**

(13) **B**

-
- (21) 1-2014-03539 (22) 28.03.2013
(86) PCT/US2013/034464 28.03.2013 (87) WO2013/149074 03.10.2013
(30) 61/616,827 28.03.2012 US
(45) 25.03.2019 372 (43) 26.01.2015 322
(73) DISCOVERY LABORATORIES, INC. (US)
Suite 100, 2600 Kelly Road, Warrington, Pennsylvania 18976-3622, United States of America
(72) Sergio CESCO-CANCIAN (US), Thomas HOY (US), Edward H. TRAPPLER (US),
Michael S. THOMAS (US)
(74) Văn phòng Luật sư Ân Nam (ANNAM IP & LAW)
-

(54) **CHẤT HOẠT ĐỘNG BỀ MẶT TRONG PHỐI TỔNG HỢP DẠNG ĐÔNG KHÔ
VÀ QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ NÓ**

(57) Sáng chế đề cập đến các chất hoạt động bề mặt trong phối dạng đông khô có diện tích bề mặt riêng và độ xốp tăng lên. Ngoài ra, sáng chế đề còn cập đến các phương pháp tạo ra các chất hoạt động bề mặt trong phối dạng đông khô theo sáng chế.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng rắn và phương pháp sản xuất chất này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chất hoạt động bề mặt trong phổi là hỗn hợp phức của các chất béo và các protein thúc đẩy sự tạo ra lớp đơn ở bề mặt ngăn cách khí - dịch ở phế nang và, bằng cách giảm sức căng bề mặt, sẽ ngăn ngừa tình trạng xẹp phế nang trong quá trình thở ra. Chất hoạt động bề mặt trong phổi phủ biểu mô phế nang của phổi động vật có vú trưởng thành. Chất hoạt động bề mặt trong phổi tự nhiên đã được mô tả là “phức hợp lipoprotein” vì nó chứa cả các phospholipit và các apoprotein tương tác để làm giảm sức căng bề mặt ở bề mặt ngăn cách khí-dịch ở phổi. Bốn protein đã được phát hiện là có liên kết với chất hoạt động bề mặt trong phổi, cụ thể là SP-A, SP-B, SP-C, và SP-D. Đặc biệt là, SP-B là cần thiết cho hoạt động sinh lý của chất hoạt động bề mặt trong phổi. Đó là liệu pháp được chấp nhận để điều trị một loạt các rối loạn hô hấp bằng cách đưa chất hoạt động bề mặt trong phổi đến phổi của bệnh nhân.

Từ quan điểm dược lý nêu trên, chất hoạt động bề mặt trong phổi ngoại sinh tối ưu để sử dụng trong điều trị sẽ được tổng hợp hoàn toàn trong phòng thí nghiệm. Về vấn đề này, một chất tương tự SP-B đã được phát hiện là hữu ích là KL4, đó là polypeptit dạng cation của axit amin số 21.

Một phương pháp sản xuất chất hoạt động bề mặt trong phổi trên quy mô thương mại để dùng trong y học là quy trình tận dụng hoạt động của thiết bị làm bay hơi màng mỏng (thin film evaporator (TFE)). Quy trình được áp dụng để sản xuất chất hoạt động bề mặt trong phổi KL4 bao gồm các bước sau đây: 1) hòa tan bốn thành phần tạo chế phẩm cơ bản, dipalmitoyl phosphatidylcholin (DPPC), palmitoyloleoyl phosphatidylglycerol (POPG) và axit palmitic (PA) và KL4 trong etanol; 2) loại bỏ etanol sử dụng thiết bị TFE;

và 3) định lượng chất phân tán cuối cùng vào các lọ thủy tinh. Chính quá trình vận hành thiết bị TFE phức tạp và có sự giới hạn về dung tích. Cụ thể, thiết bị TFE có diện tích màng bay hơi là 1 ft² (0,092903 m²) sản xuất mẻ 40 lít và thiết bị tương đương lớn nhất có sẵn là TFE10 ft² (0,92903 m²). Điều này hạn chế dung tích mẻ là điều không mong muốn do các chỉ số bổ sung được thông qua đối với chất hoạt động bề mặt KL4 đòi hỏi lượng chất hoạt động bề mặt ngày càng tăng. Hơn nữa, quy trình được thực hiện dưới các điều kiện vô trùng góp phần đáng kể vào chi phí, độ linh hoạt trong kế hoạch sản xuất và sự phức tạp của sản phẩm.

Bên cạnh chi phí và sự phức tạp của việc sử dụng TFE, một rắc rối khác vẫn tồn tại do chế phẩm được lưu trữ ở trạng thái lỏng. Bởi vì các thành phần polypeptit và lipit của chế phẩm có thể bị biến chất, nên dung dịch phải được giữ đông lạnh để làm chậm quá trình biến chất và đạt được sự ổn định lâu dài.

Sự đông khô hoặc sấy đông khô là quy trình quan trọng trong sản xuất các chế phẩm dạng rắn. Các chế phẩm dạng rắn có độ ổn định dài hơn so với các chế phẩm dạng lỏng và dễ vận chuyển và lưu trữ. Trong quy trình đông khô, chế phẩm có thể được sấy khô đến 2% hoặc thấp hơn hàm lượng ẩm còn lại mà không cần nâng nhiệt độ lên trên 30°C. Do đó, quy trình này ít có khả năng gây ra sự biến chất chế phẩm do nhiệt so với quy trình xử lý ở nhiệt chiều cao như, ví dụ, sấy phun.

Quy trình đông khô liên quan đến đóng băng chế phẩm dạng lỏng và loại bỏ dung môi được kết hợp với nó nhờ sự thăng hoa trực tiếp từ pha rắn thành pha hơi mà không cần qua pha lỏng trung gian. Thông thường, quy trình đông khô gồm có ba giai đoạn, giai đoạn đóng băng, giai đoạn sấy sơ cấp; và giai đoạn sấy thứ cấp.

Đóng băng là quá trình hóa rắn chất lỏng ban đầu bằng cách làm lạnh vật liệu xuống dưới nhiệt độ đã cho thấp hơn hoặc bằng 0°C. Sấy sơ cấp là một phần của chu trình đông khô trong đó sự thăng hoa của phần lớn dung môi đóng băng được loại bỏ trong khi vật liệu được giữ ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ ngưỡng để duy trì kết cấu được thiết lập trong khi đóng băng. Sấy thứ cấp là quá trình khử hấp phụ một phần hơi ẩm còn lại và thường được kiểm soát ở nhiệt độ 25°C hoặc cao hơn. Các thông số xử lý quan trọng đi kèm với ba bước này là nhiệt độ giá đỡ, áp suất buồng đông khô và thời gian.

Quy trình đông khô tiếp tục phát triển qua nhiều thập kỷ. Mặc dù đã phát triển được vốn kiến thức phong phú trong lĩnh vực này, nhưng vẫn còn những thách thức của việc sản xuất bánh chất hoạt động bề mặt phân bố đồng đều có kết cấu cơ học ổn định trên quy mô thương mại với chi phí và thời gian hợp lý.

Patent Mỹ số 5,952,303 của Bornstein mô tả chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô thu được bằng cách đông khô huyền phù trong nước của hỗn hợp các phospholipit, axit palmitic và peptit.

Patent Mỹ số 7,582,312 của Johnson mô tả quy trình tạo ra chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô bằng cách đông khô chế phẩm dạng lỏng của các phospholipit, axit palmitic và peptit trong hệ dung môi chứa 20% hoặc nhiều hơn dung môi hữu cơ.

Việc sử dụng các quy trình đông khô được mô tả trong các patent nêu trên để đông khô chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng lỏng có dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 5% đến 20% tạo ra vật liệu vụn và giòn không dùng được để phân phối thương mại. Việc sản xuất chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp sử dụng các quy trình đông khô được mô tả đó dẫn đến sự dâng vật liệu từ đáy lọ thủy tinh (“nổi lên”) dẫn đến sự truyền nhiệt giảm, phân bố nhiệt không đều và tạo ra sản phẩm có các thuộc tính chất lượng thay đổi chẳng hạn như hình thái tự nhiên và dư độ ẩm.

Do đó, có nhu cầu về các phương pháp cải tiến để sản xuất các chế phẩm chất hoạt động bề mặt trong phổi và các chế phẩm chất hoạt động bề mặt trong phổi được cải thiện. Sáng chế đề xuất giải pháp cho vấn đề sản xuất chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp đông khô, ổn định về mặt hóa học và cơ học, mà không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của nó trong quy trình đông khô.

Tất cả các tài liệu tham khảo được dẫn ra ở đây được kết hợp toàn bộ để tham khảo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một khía cạnh của sáng chế đề xuất quy trình tạo ra chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô có sự nổi lên của bánh đông khô được giảm hoặc loại bỏ trong suốt quy trình. Quy trình bao gồm cấp vào buồng đông khô hỗn hợp tiền đông khô

bao gồm ít nhất một phospholipit và peptit tổng hợp được phân tán trong dung môi có dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 3% (thể tích/thể tích) đến 20% (thể tích/thể tích) thể tích tổng thể tích hỗn hợp tiền đông khô với phần còn lại là nước và/hoặc chất đệm, trong đó hỗn hợp tiền đông khô được chứa đầy trong đồ chứa và, trong đó peptit tổng hợp có ít nhất 10 gốc axit amin và được biểu diễn bằng chế phẩm:



trong đó, Z là gốc axit amin ưa nước và U là gốc axit amin kỵ nước; trong đó, mỗi Z độc lập là R, D, E hoặc K; và mỗi U độc lập là V, I, L, C, Y, hoặc F; và trong đó, a là số nguyên với giá trị trung bình nằm trong khoảng từ 1 đến 5; b là số nguyên với giá trị trung bình nằm trong khoảng từ 3 đến 20; c là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10; và d là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3; hạ nhiệt độ bên trong buồng đông khô xuống để bắt đầu lạnh và hóa rắn hỗn hợp tiền đông khô ở giai đoạn đóng băng; và tiến hành giai đoạn ủ trước giai đoạn sấy sơ cấp và nhờ đó giảm hoặc loại bỏ sự nổi lên của bánh đông khô trong chất hoạt động bề mặt trong phối tổng hợp dạng đông khô.

Theo một phương án, quy trình còn bao gồm tiến hành giai đoạn đóng băng trong quá trình hạ nhiệt độ bên trong buồng đông khô, trong đó hỗn hợp tiền đông khô được làm lạnh đến nhiệt độ thứ nhất dưới -45°C ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến $1,0^{\circ}\text{C/phút}$ và giữ hỗn hợp tiền đông khô ở nhiệt độ thứ nhất trong khoảng thời gian thứ nhất đủ để hóa rắn ít nhất 76% dung môi để tạo ra hỗn hợp hóa rắn thứ nhất; tiến hành giai đoạn ủ và nhờ đó làm giảm hoặc loại bỏ sự nổi lên của bánh đông khô của hỗn hợp hóa rắn thứ nhất, trong đó hỗn hợp hóa rắn thứ nhất (i) được gia nhiệt đến nhiệt độ thứ hai được chọn để làm giảm hoặc loại bỏ sự nổi lên của hỗn hợp hóa rắn thứ nhất, (ii) được giữ ở nhiệt độ thứ hai trong khoảng thời gian thứ hai đủ để làm giảm hoặc loại bỏ sự nổi lên của hỗn hợp hóa rắn thứ nhất, và (iii) được làm lạnh đến nhiệt độ thứ ba dưới -45°C ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến $1,0^{\circ}\text{C/phút}$ để tạo ra hỗn hợp hóa rắn thứ hai, trong đó hỗn hợp hóa rắn thứ hai được giữ ở nhiệt độ thứ ba trong khoảng thời gian thứ ba đủ để thúc đẩy sự phân tách của dung môi hữu cơ không đóng băng ra khỏi hỗn hợp hóa rắn thứ hai và nhờ đó hoàn tất sự di chuyển của dung môi hữu cơ không đóng băng vào bề mặt tiếp xúc giữa đồ chứa và hỗn hợp hóa rắn thứ hai; tiến hành giai đoạn sấy sơ cấp ở áp suất giảm là 30 mT hoặc cao hơn, trong đó hỗn hợp hóa rắn thứ hai được giữ ở nhiệt độ thứ tư trong khoảng

thời gian thứ tư đủ để loại bỏ ít nhất 5% dung môi hữu cơ, sau đó gia nhiệt đến nhiệt độ thứ tư đủ để giữ hỗn hợp hóa rắn thứ hai không bị nổi lên trong đồ chứa và duy trì kết cấu được thiết lập trong suốt giai đoạn ủ, và tiếp tục giữ ở nhiệt độ thứ tư trong khoảng thời gian thứ năm đủ để loại bỏ ít nhất 70% dung môi và nhờ đó tạo ra hỗn hợp hóa rắn thứ ba; và tiến hành giai đoạn sấy thứ cấp ở áp suất giảm trong khoảng thời gian thứ sáu đủ để tạo ra chất hoạt động bề mặt trong phối tổng hợp dạng đông khô có hàm lượng dung môi còn lại tối đa là 2%.

Theo các phương án nhất định của quy trình, tỷ lệ thể tích hỗn hợp tiền đông khô trong đồ chứa so với thể tích bình đứng nằm trong khoảng từ 28% đến 68%.

Theo các phương án nhất định của quy trình theo sáng chế, tỷ lệ chiều cao của hỗn hợp tiền đông khô trong đồ chứa so với đường kính đồ chứa nằm trong khoảng từ khoảng 0,3 đến khoảng 0,8.

Theo các phương án nhất định, quy trình bao gồm chuẩn bị hỗn hợp tiền đông khô trong đó dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ khoảng 3% đến khoảng 15%. Cụ thể hơn, dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ khoảng 5% đến khoảng 10%. Cụ thể hơn nữa, dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ khoảng 7% đến khoảng 10%.

Bất kỳ biến thể nào được mô tả ở trên về quy trình đều có thể được thực hiện bằng cách (1) tiến hành giai đoạn đóng băng sao cho hỗn hợp tiền đông khô được làm lạnh đến nhiệt độ thứ nhất là $-50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến $1,0^{\circ}\text{C}/\text{phút}$; (2) tiến hành giai đoạn ủ sao cho hỗn hợp hóa rắn thứ nhất được (i) gia nhiệt đến nhiệt độ thứ hai là $-22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến $1,0^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, (ii) giữ ở nhiệt độ thứ hai trong khoảng thời gian thứ hai từ 4 đến 8 giờ, (iii) làm lạnh đến nhiệt độ thứ ba là $50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến $1,0^{\circ}\text{C}/\text{phút}$; và (iv) giữ ở nhiệt độ thứ ba trong khoảng thời gian thứ ba từ 3 đến 8 giờ; và (3) tiến hành giai đoạn sấy sơ cấp ở áp suất được chọn nằm trong khoảng từ 30mT đến 200mT và nhiệt độ khô thứ nhất được chọn nằm trong khoảng từ -25°C đến 0°C được ủ từ nhiệt độ $-50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, và còn được giữ ở giai đoạn sấy sơ cấp trong thời gian ít nhất là 10 giờ.

Theo các phương án nhất định của quy trình được tóm lược ở trên, giai đoạn sấy thứ cấp được tiến hành ở áp suất được chọn nằm trong khoảng từ 30mT đến 200mT và

hiệt chiều cao nhất là $46^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Theo các phương án khác nhau về các quy trình nêu trên, hỗn hợp tiền đông khô bao gồm peptit có mã nhận dạng trình tự (SEQ ID) số:1 (polypeptit KL4), dipalmitoyl phosphatidylcholin (DPPC), palmitoyloleoyl phosphatidylglycerol (POPG) và axit palmitic, và quy trình tạo ra chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô với diện tích bề mặt riêng ít nhất là $2,2 \text{ m}^2/\text{g}$. Theo các phương án cụ thể, diện tích bề mặt riêng nằm trong khoảng từ $2,2 \text{ m}^2/\text{g}$ đến $3,7 \text{ m}^2/\text{g}$. Theo các phương án nhất định, chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô có độ xốp trên 40% thể tích của tổng diện tích chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô.

Khía cạnh khác của sáng chế đề xuất chế phẩm chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô bao gồm một hoặc nhiều phospholipit và polypeptit tổng hợp có ít nhất 10 gốc axit amin và được biểu diễn bằng chế phẩm:

$$(\text{Z}_a\text{U}_b)_c\text{Z}_d$$

trong đó, Z là gốc axit amin ưa nước và U là gốc axit amin kỵ nước; trong đó, mỗi Z độc lập là R, D, E hoặc K; và mỗi U độc lập là V, I, L, C, Y, hoặc F; và trong đó, a là số nguyên có giá trị trung bình nằm trong khoảng từ 1 đến 5; b là số nguyên có giá trị trung bình nằm trong khoảng từ 3 đến 20; c là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10; và d là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 3, trong đó chế phẩm chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô có diện tích bề mặt riêng ít nhất là $2,7 \text{ m}^2/\text{g}$.

Theo các phương án nhất định, chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô có diện tích bề mặt riêng nằm trong khoảng từ $2,7 \text{ m}^2/\text{g}$ đến $3,7 \text{ m}^2/\text{g}$.

Theo các phương án nhất định, chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô có độ xốp trên 40% thể tích của tổng diện tích của chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô.

Theo các phương án nhất định, chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô bao gồm peptit có mã nhận dạng trình tự số 1 (polypeptit KL4), dipalmitoyl phosphatidylcholin (DPPC), palmitoyloleoyl phosphatidylglycerol (POPG) và axit palmitic.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là biểu đồ dạng cột minh họa sự di chuyển của vật liệu đông khô trong lọ thủy tinh khi đảo ngược hoặc không có sự di chuyển một số lọ thủy tinh chứa vật liệu đông khô di chuyển khi đảo ngược (được thể hiện là các cột màu đen) và một số lọ thủy tinh chứa vật liệu đông khô không di chuyển khi đảo ngược (được thể hiện là các cột được gạch chéo) (xem ví dụ 5).

Fig.2 là biểu đồ minh họa sự nổi lên của vật liệu trong quá trình đông khô (xem ví dụ 5).

Fig.3A và Fig.3B là các ảnh chụp hiển vi quét điện tử (scanning electron microscope (SEM)) của chất hoạt động bề mặt trong phổi dạng đông khô theo sáng chế được đựng trong các lọ thủy tinh 30 ml, ở độ khuếch đại X20, bề mặt A và bề mặt B tương ứng.

Fig.4A và Fig.4B là các ảnh chụp SEM của chất hoạt động bề mặt trong phổi dạng đông khô có chế phẩm II do công ty Bornstein Lyo Cycle sản xuất trong các lọ thủy tinh 30 ml như được mô tả trong ví dụ 3, ở độ khuếch đại X20, bề mặt A và bề mặt B tương ứng.

Fig.5A và Fig.5B là các ảnh chụp SEM của chất hoạt động bề mặt trong phổi dạng đông khô theo sáng chế được đựng trong các lọ thủy tinh 30 ml, ở độ khuếch đại X100, bề mặt A và bề mặt B tương ứng.

Fig.6A và Fig.6B là các ảnh chụp SEM của chất hoạt động bề mặt trong phổi dạng đông khô có chế phẩm II do công ty Bornstein Lyo Cycle sản xuất trong các lọ thủy tinh 30 ml như được mô tả trong ví dụ 3, ở độ khuếch đại X100, bề mặt A và bề mặt B tương ứng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Đã có phát hiện là chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng khô có các hạt chất rắn được phân bố đồng nhất được sắp xếp trong cấu trúc cứng, ổn định về cơ học, có khả năng chống lại sự vận chuyển bởi không khí và việc đóng gói có thể được thực hiện

bằng quy trình đông khô cải tiến.

Chế phẩm đông khô được kỳ vọng có dạng đồng nhất về cấu trúc và kết cấu và độ bền cơ học tốt (ví dụ, có khả năng chịu được bốc xếp và vận chuyển) để thích hợp cho phân phối thương mại. Dạng đồng nhất gắn liền với độ ổn định được cải thiện và ít biến đổi về hoạt tính của thuốc, đặc tính cảm quan của thuốc, độ ẩm, và thời gian phục hồi.

Việc đông khô các chế phẩm chứa huyền phù của chế phẩm liposom và dung môi hữu cơ là một nhiệm vụ phức tạp do dung môi hữu cơ bị mắc kẹt như là một chất lỏng không đóng băng và bay hơi ở tỉ lệ khác nhau khi so sánh với các chất lỏng đóng băng khác ví dụ như nước đá, và do đó, tạo ra sự thay đổi trong thành phần dung môi dẫn đến sự mất kiểm soát quy trình, khó duy trì các thông số quy trình quan trọng của áp suất buồng đông khô, cũng như khó khăn trong việc kiểm soát sự có mặt của dung môi còn lại trong sản phẩm khô.

Các nỗ lực để xuất chất hoạt động bề mặt trong phối tổng hợp khô từ hỗn hợp tiền đông khô chứa dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 3% đến 20% sử dụng trong các quy trình đông khô được mô tả trong các patent Mỹ số 5,952,303 và 7,582,312 không thành công để tạo ra các sản phẩm có thể chấp nhận về mặt thương mại. Các sản phẩm thu được có các hạt chất rắn được phân bố không đều dọc bề mặt của các đồ chứa bột đông khô; chất rắn dường như bị nổi lên trong lọ thủy tinh trong quá trình xử lý và có bề mặt bột bị vỡ vụn.

Các thay đổi thông thường về nhiệt độ giá đỡ, áp suất và thời gian không tạo ra sản phẩm mong muốn có dạng đồng đều về cấu trúc và kết cấu và độ bền vật lý tốt (ví dụ, sản phẩm đông khô có khả năng duy trì hình dáng và giữ đúng vị trí khi đảo ngược lọ thủy tinh chứa bột đông khô). Bước đầu tiên trong việc phát triển quy trình đông khô theo sáng chế là để xác định dữ liệu phân tích nhiệt liên quan đến nguyên liệu gắn liền với các thành phần cụ thể và tỷ lệ của các thành phần đó chứa trong chế phẩm (hầu hết các tá dược vô định hình cũng chứa muối trong chất đệm và dung môi hữu cơ). Sự phân tích nhiệt này được tiến hành bằng cách thực hiện quan sát hiển vi sự đông khô (Freeze Drying Microscopy (FDM)), đo điện trở (Electrical Resistance (ER)) và đo nhiệt lượng quét vi sai ở nhiệt độ thấp (Low Temperature Differential Scanning Calorimetry (LT-DSC)). Phân

tích nhiệt đưa ra thông tin quan trọng chẳng như dữ liệu về nhiệt độ hóa rắn thích hợp và nhiệt độ ngưỡng trong đó để sấy nguyên liệu một cách an toàn trong sự có mặt của nước đá trong quá trình sấy sơ cấp để đảm bảo duy trì các cấu trúc được thiết lập trong bước đông băng. Dựa vào hiểu biết về đặc điểm của các thành phần hữu cơ và diễn biến của quy trình, dự kiến không thể đạt được sự hóa rắn hoàn tất ở các điều kiện được sử dụng cho quy trình đông khô thường. Thực tế này là một thách thức xử lý đáng kể vì dung dịch gộp (tức là, hỗn hợp tiền đông khô) có trong hệ dung môi có các thành phần dễ bay hơi, chẳng hạn như dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 3% đến 20%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3% đến 15%, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5% đến 10% và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 7% đến 10% (thể tích/thể tích) tổng thể tích của hỗn hợp tiền đông khô với phần còn lại là nước và/hoặc chất đệm. Các thành phần dễ bay hơi có điểm sôi thấp hơn nhiệt độ có thể thực hiện được bởi bình ngưng. Do đó, dung môi hữu cơ có thể không bị hóa rắn bởi bình ngưng và thường không có hiệu quả thu gom bởi bình ngưng trong khi xử lý sấy, như với phương pháp thông thường. Trong quy trình này, trong suốt giai đoạn sấy của quá trình đông khô, hơi hữu cơ tách ra từ các nguyên liệu với áp suất buồng giảm, được thu gom tức thời trên bề mặt của bình ngưng do sự chênh lệch nhiệt độ giữa các dung môi trong sản phẩm và bình ngưng. Các hơi này, trong khi trên bề mặt của bình ngưng, ở trạng thái lỏng. Áp suất hơi kết hợp với mỗi dung môi hữu cơ thu được dưới dạng chất lỏng khi giảm nhiệt độ của bình ngưng, là đủ cao hơn so với áp suất buồng, gây ra sự chuyển đổi tiếp theo của các chất lỏng hữu cơ trở lại trạng thái hơi. Chuỗi sự kiện này được gọi là sự hồi lưu (hơi > lỏng > hơi) và liên tục lặp đi lặp lại trong suốt quá trình cho đến khi, quá thời gian, các hơi hữu cơ thoát khỏi sức hút của bình ngưng và được lấy ra khỏi buồng bằng bơm chân không. Trong khi đó, nguyên liệu ở trạng thái hồi lưu đang liên tục giải phóng nhiệt lượng (hơi biến thành lỏng) và tiêu thụ nhiệt lượng (lỏng hóa thành hơi) để chuyển đổi từ pha này sang pha khác. Kết quả là, nguyên liệu thu được trên bình ngưng phải trải qua sự hấp thu và giải phóng nhiệt kết hợp với sự hồi lưu và không còn có thể duy trì các điều kiện trạng thái ổn định. Nếu sự thăng hoa của nước đá diễn ra ở mức chiều cao trong quá trình hồi lưu các dung môi hữu cơ, cả sự biến động nhiệt độ không đổi và lượng diện tích bề mặt tự do của bình ngưng, không có sự hồi lưu dung môi hữu cơ, sẽ tác động lên sự ngưng tụ hơi nước để tạo thành nước đá, áp suất buồng được kiểm soát và cuối cùng, khi thăng hoa nước đá từ sản phẩm. Phương pháp thông thường

để đông khô là thăng hoa nước đá để tạo ra hơi nước và sự chuyển đổi hơi nước trở lại thành nước đá khi được thu vào bình ngưng và được coi là tình trạng giải pháp kỹ thuật tiền thân. Dựa vào thách thức gây ra bởi sự có mặt của các dung môi hữu cơ, kết hợp với sự nổi lên của bánh đông khô trong quá trình xử lý, ứng dụng sấy sơ cấp hai bước được thực hiện để khắc phục thành công các ảnh hưởng này. Mục đích của ứng dụng sấy sơ cấp hai bước là để phân tách sự bay hơi của dung môi hữu cơ bên ngoài bất kỳ từ bề mặt tiếp xúc chất nền/lọ thủy tinh với sự thăng hoa của nước đá. Khối phổ kế đã được sử dụng để đo mức độ khí dư trong buồng đông khô. Các dữ liệu này chỉ ra rằng phân dung môi hữu cơ được loại bỏ trong giai đoạn ban đầu của quá trình sấy sơ cấp và các thông số chu kỳ đích cho giai đoạn cụ thể này dẫn đến mức dung môi hữu cơ giảm, cho thấy quy trình này có thể được phát triển tới giai đoạn thứ hai của sấy sơ cấp. Việc sử dụng kỹ thuật này, bằng cách thực hiện giai đoạn dành riêng để loại bỏ các dung môi tự do thông qua sự bay hơi, dẫn đến việc loại bỏ sự nổi lên của bánh đông khô trong sự biểu hiện đích đối với thời gian thứ nhất. Sau đó có lập luận rằng việc loại bỏ các dung môi hữu cơ không đóng băng trong giai đoạn đầu này có thể làm giảm hiện tượng nổi lên của bánh đông khô nếu các thông số giai đoạn có liên quan như tốc độ làm lạnh, ủ và làm ấm để sấy sơ cấp có thể được kiểm soát hơn nữa để phá vỡ tính di động của sản phẩm liên quan đến sự nổi lên trong lọ thủy tinh.

Các tác giả đã xác định rằng một trong số các nguyên nhân của sự nổi lên là sự hóa rắn không thích hợp đạt được bởi nhiệt độ đóng băng được sử dụng trước đó là -30°C và -40°C . Nhiều nỗ lực để làm giảm sự nổi lên bằng cách hạ nhiệt độ giá đỡ xuống -45°C và nâng áp suất buồng trong bước sấy sơ cấp không đem lại hiệu quả cải thiện đáng kể. Sự có mặt của alcohol trong hỗn hợp đông khô tạo ra hiệu quả “bôi trơn”; khi bánh đông khô được nâng đến nhiệt độ ấm hơn, sự có mặt của alcohol dọc các mép của lọ thủy tinh có thể làm cho bánh đông khô bị nổi lên. Bằng cách hạ nhiệt độ đóng băng tối ưu là -45°C hoặc thấp hơn trong pha hóa rắn, bao gồm, trước giai đoạn sấy sơ cấp, xử lý nhiệt khi ủ để làm cho nhiều dung môi hữu cơ được tách ra khỏi hỗn hợp hơn, sự nổi lên được loại bỏ. Các tham số được ưu tiên cho pha đóng băng là như sau: làm lạnh từ từ đến nhiệt độ giá đỡ là -45°C hoặc thấp hơn, tốt hơn là từ -40°C đến -50°C (“nhiệt độ hóa rắn tối ưu”), sau đó giữ ở nhiệt độ giá đỡ trong thời gian 1-10 giờ, tốt hơn là, 2-8 giờ, tốt hơn nữa là 3-5 giờ, tất cả đều diễn ra ở áp suất khí quyển. Việc làm lạnh từ từ bắt đầu sau khi hỗn hợp tiền đông khô

được cân bằng ở nhiệt độ 2-8°C trong vài giờ trên giá đỡ, và sau đó bắt đầu hạ nhiệt độ ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1°C/phút.

Hơn nữa, việc cố gắng cải thiện thời gian xử lý và vẫn duy trì độ đồng đều và bề ngoài yêu cầu, các tác giả đã phân tích tỷ lệ giữa thể tích mẫu và kích thước của lọ. Do sự nổi lên của bánh đông khô là hiện tượng hiếm gặp, nên việc đánh giá trạng thái trong các kích thước lọ khác nhau riêng biệt dựa vào việc tạo ra diện tích bề mặt lớn hơn đối với bánh đông khô đóng băng để kết dính hơn là phương pháp đánh giá các kích thước lọ khác nhau thông thường dựa trên việc đạt được chiều cao nạp liệu tối thiểu trong lọ thủy tinh. Điều ngạc nhiên là, đã phát hiện được rằng việc thay đổi kích thước của các lọ từ dung tích 20 ml đến dung tích 50 ml, trong khi có lượng chất nạp ban đầu giống nhau (13,7 ml), không tạo ra sự cải thiện tương ứng về hình dạng của bánh đông khô đông khô từ lọ có kích thước nhỏ hơn tới lọ có kích thước lọ lớn nhất. Trong khi các mẫu lọ 30 ml có bánh đông khô được phân bố đồng đều hơn so với các mẫu lọ 20 ml, các mẫu lọ 50 ml có độ đồng đều thấp hơn so với các mẫu lọ 20ml. Việc thiếu cải thiện trong nguyên liệu được xử lý trong lọ có dung tích 50 ml khá tương quan với các mức tăng của sự nổi lên của bánh đông khô quan sát được trong đồ chứa này được kết hợp với chiều cao bánh đông khô thu được, khi được so sánh với chiều cao bánh đông khô của lọ 20cc và lọ 30cc. Khi tăng lượng chất nạp vào lọ, tỷ lệ giữa thể tích nạp (thể tích hỗn hợp tiền đông khô) và thể tích lọ (hoặc loại hộp đựng khác để chứa lượng chất nạp đó) và/hoặc tỷ lệ chiều cao chất nạp của hỗn hợp tiền đông khô trong lọ và đường kính của lọ nên được quan sát để loại bỏ sự nổi lên của vật liệu nạp vào lọ. Tỷ lệ của chiều cao chất nạp trong lọ với đường kính lọ nên nằm trong khoảng từ 0,3 đến 0,5, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 0,4 đến 0,7, và tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 0,6. Tỷ lệ thể tích chất nạp trong lọ với thể tích lọ cần nằm trong khoảng từ 28% đến 68%, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 35% đến 55%. Cần hiểu phải rằng thể tích của lọ được sử dụng trong các phép tính này là các thể tích “được liệt kê” (tức là, các thể tích được liệt kê trong danh mục và tập san thương mại) và không phải là thể tích bên trong thực tế, trong đó các thể tích được liệt kê có thể chênh lệch với các thể tích thực tế khoảng 10%.

Các tác giả đã xác định rằng việc bổ sung giai đoạn ủ sau giai đoạn đóng băng hoặc dưới dạng một bước trung gian trước khi đạt đến nhiệt độ đóng băng tới hạn giúp tạo ra

bánh đông khô cứng hơn với phần rìa mở rộng sẽ dính chặt với các mép và đáy của lọ thủy tinh, và do đó, loại trừ được sự nổi lên của chất rắn. Mục tiêu khác đạt được bằng cách bổ sung giai đoạn ủ là để có được sự tăng tốc độ thăng hoa và nhờ do đó, giảm trong thời gian xử lý tổng thể, mà không ảnh hưởng đến hình dạng bánh.

Giai đoạn ủ bây giờ sẽ được mô tả trong chi tiết. Khái niệm “giai đoạn ủ” có nghĩa là các điều kiện để xử lý nhiệt và thúc đẩy sự phân tách thành phần và/hoặc sự kết tinh thành phần của hỗn hợp. Sự xử lý nhiệt này có thể dẫn đến (A) làm lạnh đến nhiệt độ trung gian sau đó tiếp tục làm lạnh đến nhiệt độ thấp tới hạn (“nhiệt độ đóng băng tới hạn”), hoặc (B) làm lạnh đến nhiệt độ thấp sau đó làm nóng đến nhiệt độ trung gian, sau đó tiếp tục làm lạnh đến một nhiệt độ thấp tới hạn, hoặc (C) làm lạnh đến nhiệt độ thấp, sau đó làm nóng đến nhiệt độ trung gian. “Giai đoạn ủ” được dự định xảy ra trong giai đoạn đóng băng của quy trình đông khô. Việc thực hiện ủ làm tăng khả năng ngăn chặn sự nổi lên của bánh đông khô từ đáy lọ trong quá trình xử lý bằng cách tạo ra khung đông lạnh cứng hơn. Ngoài ra, việc ủ thúc đẩy sự di chuyển của dung môi không đóng băng đến bề mặt tiếp xúc lọ/khung và tiếp tục thúc đẩy sự phân tách sau đó của dung môi từ sản phẩm trong các điều kiện ban đầu được sử dụng để sấy sơ cấp, làm giảm hiệu quả lượng dung môi và tạo ra chất tan, tức là, các muối API (Active Pharmaceutical Ingredient - dược chất) và hệ đệm, cứng hơn trong khi nước không đóng băng bất kỳ được chuyển thành nước đá. Nhiệt độ trung gian được lựa chọn dựa trên đặc tính thị giác và phân tích nhiệt độ thấp đặc điểm hình ảnh của vật liệu với hoặc là nhiệt độ chuyển tiếp thủy tinh (T_g') hoặc là nhiệt độ tương ứng với sự thay đổi vật lý có thể quan sát được xác định. Nhiệt độ thấp được lựa chọn dựa trên đặc tính thị giác và phân tích nhiệt của vật liệu mà đo được nhiệt độ hóa rắn hoàn toàn. T_g' hoặc sự thay đổi vật lý có thể quan sát được khác, như sự thay đổi trong độ mờ hoặc di chuyển tương tự chất xác định sản phẩm cần được ủ ở nhiệt độ trung bình nào và xác định nhiệt độ hóa rắn hoàn toàn nào mà điểm thiết lập nhiệt độ thấp cần được sử dụng để thúc đẩy vật liệu đông lạnh lý tưởng để tiến hành sấy khô sơ cấp. Cụ thể là, vật liệu cần được ủ ở nhiệt độ cao hơn T_g' vài độ hoặc ở sự thay đổi vật lý được quan sát, và, ở mức tối thiểu, vật liệu cần được làm lạnh tới nhiệt độ bằng hoặc thấp hơn nhiệt độ hóa rắn hoàn toàn. Đối với vật liệu được mô tả là Chế phẩm I trong tài liệu này, trong quá trình phân tích nhiệt, sự thay đổi vật lý được quan sát là chuyển động tương tự chất lỏng được quan sát ở nhiệt độ -28°C (nhiệt độ mà tại đó sự chuyển

động tương tự chất lỏng được quan sát dưới kính hiển vi đối với sự đông khô). Theo các phương án nhất định, nhiệt độ hóa rắn hoàn toàn được quan sát thấy ở -45°C . Các mầm hóa rắn phải được xác nhận trước trước khi giữ ở hoặc là nhiệt độ thấp hoặc là nhiệt độ trung gian. Các nhiệt độ sẽ là giống nhau hoặc tương tự nhau đối với mỗi biến thể A, B và C, tuy nhiên, thứ tự trong đó chúng được thực hiện sẽ thay đổi. Việc lựa chọn nhiệt độ có thể dựa trên các thành phần trong chế phẩm hoặc nhiệt độ ngưỡng. Nhiệt độ ngưỡng được xác định là nhiệt độ trong đó nhiệt độ sản phẩm cần được giữ thấp hơn trong quá trình sấy sơ cấp, trong sự có mặt của nước đá, để tránh vỡ vụn, tan chảy, hoặc trong một số trường hợp, sự nổi lên của bánh đông khô.

Theo các phương án nhất định, bước ủ được thực hiện như được mô tả trong biến thể (B) ở trên. Theo các phương án này, giai đoạn ủ bao gồm làm ấm bánh đông khô từ $-45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (nhiệt độ đóng băng tới hạn) lên $-22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (nhiệt độ trung gian) ở tốc độ được chọn nằm trong khoảng từ $0,1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến $1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ (bước làm ấm) và giữ trong khoảng thời gian đủ để thúc đẩy sự phân tách dung môi hữu cơ khỏi hỗn hợp tan và tạo ra chất rắn cứng hơn để làm giảm hoặc loại bỏ sự nổi bánh đông khô, tốt nhất là, 3-8 giờ ở $-22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (bước giữ), sau đó làm lạnh lại đến $-45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ở tốc độ nằm trong khoảng từ $0,1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến $1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ (bước làm lạnh) và giữ trong khoảng thời gian đủ để đảm bảo hóa rắn đủ, ví dụ, trong thời gian từ 3-8 giờ, tốt nhất là 4 giờ, ở $-45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, trong đó tất cả bốn bước được tiến hành ở áp suất khí quyển. Theo các phương án nhất định, bước ủ được tiến hành như được mô tả trong các ví dụ 2, và ví dụ 9 đến ví dụ 13.

Ngoài ra, sự hóa rắn đủ có thể đạt được bằng việc làm lạnh trực tiếp đến một nhiệt độ thấp tới hạn mà không cần bước giữ cuối cùng bằng cách làm lạnh các lọ ở tốc độ không đổi được nằm trong khoảng từ $0,1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến $1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến nhiệt độ thấp tới hạn cho đến khi đạt được nhiệt độ mong muốn. Theo phương án khác (biến thể (A) ở trên), giai đoạn ủ được thực hiện như một bước trung gian trước khi đạt đến nhiệt độ thấp tới hạn trong giai đoạn đóng băng. Theo phương án này, giai đoạn ủ bắt đầu khi nhiệt độ của giá đỡ đạt đến nhiệt độ tạo mầm của sản phẩm lỏng (khoảng $-15^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) (“nhiệt độ tạo mầm”) và bao gồm việc giữ ở nhiệt độ tạo mầm trong khoảng thời gian đủ để chuyển đổi nước thành băng và tách các chất hòa tan trong hỗn hợp, nằm trong khoảng từ 45 phút đến 4 giờ (bước giữ trung gian), sau đó tiếp tục làm lạnh hỗn hợp với tốc độ từ $0,1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ đến

1,0°C/phút cho đến khi đạt được nhiệt độ đóng băng tới hạn mong muốn ($-50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) và bước giữ ở nhiệt độ đó được tiến hành cho đến giai đoạn đóng băng được hoàn tất.

Theo một phương án, giai đoạn ủ bao gồm làm ấm bánh đông khô từ $-50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ đến $-22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ở tốc độ từ 0,1 đến 1°C/phút và giữ trong thời gian từ 3-8 giờ ở $-22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, sau đó làm lạnh lại đến $-50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ở tốc độ từ 0,1 đến 1°C/phút và giữ trong thời gian từ 3-8 giờ, tốt hơn là là 4 giờ, ở $-50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, trong đó tất cả bốn bước được tiến hành ở áp suất khí quyển.

Theo các phương án nhất định, bước ủ được thực hiện như được mô tả trong biến thể (A) ở trên. Nhiệt độ trung gian có thể được lựa chọn nằm trong khoảng từ -10°C đến -35°C . Việc giữ ở nhiệt độ trung gian là trong khoảng thời gian đủ để chuyển đổi nước thành băng và tách các chất hòa tan trong hỗn hợp, nằm trong khoảng từ 45 phút đến 4 giờ. Việc tăng nhanh đến nhiệt độ đóng băng tới hạn được thực hiện ở tốc độ xấp xỉ 0,1 đến 1°C/phút sau đó giữ ở nhiệt độ đó cho đến khi giai đoạn đóng băng được hoàn tất, là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 5 giờ. Sau đó, bước sấy sơ cấp được tiến hành như được mô tả. Một ví dụ về quá trình này được mô tả trong ví dụ 14, xem bảng 16.

Giai đoạn sấy sơ cấp được thực hiện ở áp suất giảm (chân không) và bao gồm bước giữ tùy ý ở nhiệt độ của các bước trước đó trong khoảng thời gian đủ để làm bay hơi ít nhất là 5%, tốt hơn là, từ 5 đến 10% dung môi hữu cơ, tăng dần từ nhiệt độ ở bước trước $-50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ đến nhiệt độ nằm trong khoảng từ -25°C đến 0°C (nhiệt độ sấy sơ cấp) với tốc độ từ 0,1°C/phút đến 2°C/phút và áp suất từ 30 mT đến 200mT, tốt hơn là, 40 mT $\pm$ 10mT (bước đun nóng), tiếp theo sau là bước giữ ở nhiệt độ sấy sơ cấp trong thời gian đủ để thăng hoa ít nhất 70% dung môi, tốt hơn là ít nhất là 80%, tốt hơn là từ 5 đến 10% dung môi hữu cơ hoặc nếu bước giữ tùy ý không được thực hiện, thì trong thời gian đủ để thăng hoa ít nhất 80% dung môi. Bước giữ có thể kéo dài 10 giờ hoặc hơn. Theo các phương án nhất định, bước giữ là trong thời gian từ 18 đến 140 giờ, tốt hơn là từ 18 đến 100 giờ. Lựa chọn nhiệt độ cho quá trình sấy sơ cấp nằm trong khoảng từ 0°C đến -25°C là dựa trên mong muốn giữ mẫu trong lọ không bị dâng lên và sấy khô với sự duy trì cấu trúc được thiết lập trong khi đóng băng. Khả năng để tối ưu hóa thời gian của giai đoạn sấy sơ cấp được nâng cao nhờ thiết kế của giai đoạn ủ.

Tiếp theo, giai đoạn sấy thứ cấp sẽ được mô tả. Mục đích của giai đoạn sấy thứ cấp là để giảm hàm lượng ẩm còn lại trong sản phẩm trong giai đoạn sấy sơ cấp bằng cách nâng nhiệt độ của sản phẩm, thông thường là nhiệt chiều cao hơn nhiệt độ môi trường, để loại bỏ nước còn lại bất kỳ và giữ ở nhiệt độ được chọn trong khoảng thời gian đủ để tạo ra chất hoạt động bề mặt trong phối tổng hợp dạng đông khô có hàm lượng dung môi còn lại nhiều nhất là 2%. Phạm vi nhiệt độ sấy thứ cấp thông thường nằm trong khoảng từ từ 20°C đến 30°C. Tuy nhiên, phạm vi nhiệt độ sấy thứ cấp có thể nằm trong khoảng từ -7°C đến +60°C. Điểm thiết lập nhiệt độ sấy thứ cấp cần được lựa chọn dựa trên 1) việc duy trì độ ổn định của sản phẩm trong giai đoạn sấy thứ cấp bằng cách thực hiện nhiệt độ giá đỡ để duy trì nhiệt độ sản phẩm dưới Tg quan sát được ít nhất là 5°C và 2) thúc đẩy sự giải hấp phụ bằng cách thực hiện nhiệt độ làm ấm đủ để làm giảm hiệu quả lượng ẩm còn lại đến mức thông số kỹ thuật ở mức độ hợp lý về mặt thương mại. Tg quan sát được của chế phẩm I là nằm trong khoảng từ 45°C đến 51°C, nên nhiệt độ trong bước sấy thứ cấp có thể cao đến 46°C. Các kết quả độ ẩm còn lại chỉ ra rằng điểm thiết lập nhiệt độ sấy thứ cấp là 25°C là có hiệu quả để đạt được các kết quả độ ẩm còn lại. Tiếp theo, thực hiện giữ sản phẩm ở nhiệt độ sấy thứ cấp được chọn trong khoảng thời gian đủ để tạo ra sản phẩm cuối cùng với hàm lượng dung môi còn lại lớn nhất là 2%. Một cách để ước lượng xem việc sấy đã hoàn tất hay chưa là thực hiện thử nghiệm nâng áp suất (thử nghiệm đánh giá), trong đó áp suất là 10 micron chỉ ra rằng độ ẩm còn lại là thuộc thông số kỹ thuật. Theo các phương án nhất định, giai đoạn sấy thứ cấp được tiến hành bằng cách nung nóng từ nhiệt độ giá đỡ ở bước trước đó lên 25°C +/- 3°C ở tốc độ là từ 0,1 đến 1°C/phút, tốt hơn là ở tốc độ từ 0,2 đến 0,5°C/phút. Giai đoạn này cũng được tiến hành trong chân không như ở giai đoạn trước. Phạm vi áp suất được ưu tiên là từ 30mT đến 500mT, tốt hơn là, từ 40mT đến 150mT. Sau khi sản phẩm đạt đến nhiệt độ giá đỡ được chọn, bước giữ ở nhiệt độ 25°C +/- 3°C được thực hiện trong thời gian từ 4 đến 10 giờ, tốt hơn là 6 giờ.

Vật liệu đã đông khô sau đó được thổi khí trơ, ví dụ, nitơ ở áp suất 0,5 bar trước khi đóng nắp hoàn toàn và hàn kín để lưu trữ.

Để xác định khả năng tái sản xuất của các tham số chu trình đích, các thuộc tính của sản phẩm chính chẳng hạn như hồ sơ nhiệt độ, nhiệt độ chuyển thăng hoa và các đặc tính sản phẩm hoàn thiện được so sánh sau khi xử lý với các quy trình đông khô đồng

nhất. Nhiệt độ “chuyển” thăng hoa là nhiệt độ ngay trước điểm khi nhiệt độ sản phẩm đột ngột tiến đến nhiệt độ giá đỡ trong khi sấy sơ cấp. Nhiệt độ chuyển của sản phẩm chỉ ra sự hoàn tất thăng hoa trong đồ chứa cho sẵn có xét đến vị trí của cặp nhiệt đo được bố trí đúng chỗ (tâm đáy) nơi nước đá có thể được phát hiện cuối cùng. Đối với mỗi bước quan trọng của quy trình (ví dụ, ủ, đóng băng, sấy sơ cấp, chuyển thăng hóa và sấy thứ cấp), phạm vi nhiệt độ sản phẩm từ cả hai nghiên cứu đều là $0,5^{\circ}\text{C}$ cho việc ủ và đóng băng, và 1°C cho sấy sơ cấp và chuyển thăng hoa, và $1,5^{\circ}\text{C}$ cho sấy thứ cấp. Dựa vào biến thể danh nghĩa này, thuộc tính nhiệt trong khi xử lý là tính có thể tái sản xuất được xem xét. Đánh giá phạm vi thời gian kết thúc thăng hoa chỉ ra rằng sự thăng hoa đã được hoàn tất trong phạm vi 6 giờ từ thử nghiệm này đến thử nghiệm khác, cũng đề xuất khả năng tái sản xuất thích hợp. Cuối cùng, việc đánh giá sản phẩm hoàn thiện chẳng hạn như bề ngoài tự nhiên, độ ẩm còn lại, thời gian khôi phục, độ trong của dung môi, độ pH khôi phục, sự mất khối lượng khi phân tích nhiệt trọng lượng (thermogravimetric mass loss (TGA)) và phân tích nhiệt lượng quét vi sai ở nhiệt chiều cao (High Temperature Differential Scanning Calorimetry (HT-DSC)) tất cả tạo ra các kết quả có thể so sánh, còn hỗ trợ khả năng ổn định để tái sản xuất phù hợp với chất lượng sản phẩm từ thử nghiệm này đến thử nghiệm khác ở quy mô lớn hơn. Kết luận rút ra từ đánh giá của các thử nghiệm này là các tham số của quy trình đông khô được thực hiện để đông khô chất hoạt động bề mặt trong phối tổng hợp bao gồm từ 3 đến 20% dung môi hữu cơ, tốt hơn là từ 3% đến 15%, tốt hơn nữa là từ 5% đến 10% và tốt hơn nữa là từ 7% đến 10% (thể tích/thể tích) tổng thể tích của hỗn hợp tiền đông khô, là đủ để thu được vật liệu phù hợp với chất lượng các thuộc tính sản phẩm có thể chấp nhận được mà không có hiện tượng nổi lên của bánh đông khô.

Sự đông khô được thực hiện ở máy sấy đông khô bốn giá cung cấp không gian giá là tám bộ vuông, với dung tích ngưng tụ nước đá bên trong là 15 kilôgam. Bộ thiết bị này được tạo kết cấu bằng thép không gỉ loại 304L, được chứng nhận như là buồng áp suất để vận hành lên đến áp suất 20 psig với sự tiết trùng bằng hơi nước. Thiết bị đông khô thông thường gồm có buồng định áp suất, bình ngưng, hệ thống chân không với đặc điểm điều khiển áp suất, và vòng chất lưu trao đổi nhiệt tuần hoàn có khả năng hoạt động ở phạm vi nhiệt độ nằm trong khoảng từ -55°C đến 50°C .

Vật liệu đã đông khô có màu trắng, được phân tán đồng nhất trong các lọ, vật có

hình trụ (tức là, bất chước hình dạng của lọ), nén chặt, có độ co nhỏ tối thiểu khi so với chất nạp ban đầu, có kết cấu rắn không di chuyển khi đảo ngược lọ, và không có vết vật liệu hoặc vòng trên bề mặt trên của vật liệu. Vật liệu có bề mặt mờ xỉn dọc theo đỉnh, cạnh và đáy của bánh đông khô. Vật liệu đông khô đáp ứng thông số kỹ thuật về độ ẩm còn dư, DSC, khả năng khôi phục, độ pH, và độ nhớt.

Hỗn hợp tiền đông khô và chế phẩm của nó bây giờ sẽ được mô tả chi tiết. Các thành phần chính – dược chất (Active Pharmaceutical Ingredient (API)) là các phospholipit (ví dụ, dipalmitoyl phosphatidylcholin (DPPC) và palmitoyl oleoyl phosphatidylglycerol (POPG), axit palmitic (PA) và peptit phối tổng hợp (tốt nhất là, KL4).

Theo các phương án nhất định, các chất bất chước polypeptit hoạt động bề mặt trong phối là các polypeptit có trình tự gốc axit amin có độ kỵ nước tổng cộng là nhỏ hơn 0, tốt hơn là nhỏ hơn hoặc bằng -1, tốt hơn nữa là nhỏ hơn hoặc bằng -2. Giá trị độ kỵ nước tổng cộng đối với peptit được xác định bằng cách gán mỗi gốc axit amin trong peptit với giá trị độ ưa nước của nó như được mô tả trong Hopp *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 3824-3829, 1981, với sự bộc lộ của tài liệu này được kết hợp ở đây để tham khảo. Với peptit đã cho, các giá trị độ kỵ nước được cộng lại, tổng số thu được thể hiện giá trị độ kỵ nước tổng cộng.

Theo các phương án nhất định, trình tự axit amin của chất bất chước polypeptit hoạt động bề mặt trong phối chất bất chước kiểu của các gốc ưa nước và kỵ nước của SP18 và thực hiện chức năng của vùng kỵ nước của SP18 như được mô tả trong patent Mỹ số 3,789,381 được kết hợp toàn bộ ở đây. Theo các phương án nhất định, chất bất chước SP-B (Surfactant protein B) sử dụng ở đây bao gồm một polypeptit có các vùng gốc axit amin ưa nước và kỵ nước xen kẽ và được đặc trưng là có ít nhất 10 gốc axit amino có chế phẩm:



Z và U là các gốc axit amin sao cho mỗi Z và U được lựa chọn độc lập. Z là gốc axit amin ưa nước, tốt nhất là được chọn từ nhóm gồm có R, D, E và K. U là gốc axit amin kỵ nước tốt nhất là được chọn từ nhóm gồm có V, I, L, C, Y, và F. Các chữ cái “a”, “b”, “c” và “d”

là các con số chỉ ra số gốc ura nước và kỵ nước. Chữ cái “a” có giá trị trung bình nằm trong khoảng từ 1 đến 5, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 1 đến 3. Chữ cái “b” có giá trị trung bình nằm trong khoảng từ 3 đến 20, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3 đến 12, tốt nhất là, nằm trong khoảng từ 3 đến 10. Chữ cái “c” là nằm trong khoảng từ 1 đến 10, tốt hơn là, nằm trong khoảng từ 2 đến 10, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 3 đến 6. Chữ cái “d” là nằm trong khoảng từ 1 đến 3, tốt nhất là nằm trong khoảng từ 1 đến 2.

Bằng cách đề cập gốc axit amin được biểu diễn bởi Z và U được chọn một cách độc lập, có nghĩa là mỗi khi xuất hiện, gốc từ nhóm cụ thể sẽ được chọn. Đó là, khi “a” là 2, ví dụ, mỗi gốc ura nước được biểu diễn là Z sẽ được lựa chọn một cách độc lập và do đó có thể bao gồm RR, RD, RE, RK, DR, DD, DE, DK, vv. Bằng cách đề cập “a” và “b” có các giá trị trung bình, có nghĩa rằng mặc dù số gốc trong trình tự lặp (Z_aU_b) có thể thay đổi phần nào trong chuỗi peptit, các giá trị trung bình của “a” và “b” sẽ nằm trong khoảng từ 1 đến 5 và nằm trong khoảng từ 3 đến 20, tương ứng.

Theo các phương án nhất định, các chất bất chức polypeptit SP-B ví dụ có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn, các chất được minh họa trong bảng các peptit bất chức chất hoạt động bề mặt trong phổi.

Bảng các peptit bất chức chất hoạt động bề mặt trong phổi

Tên gọi ¹	Mã trình tự	Trình tự gốc axit amin
KL4	1	KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK
DL4	2	DLLLLDLLLLDLLLLDLLLLD
RL4	3	RLLLLRLLLLRLLLLRLLLLR
RL8	4	RLLLLLLLLRLLLLLLLLRLL
R2L7	5	RRLLLLLLLLRLLLLLLLLRRL
	6	RLLLCLLLRLLLLCLLLR
	7	LLLLCLLLRLLLLCLLLRLL
	8	RLLLCLLLRLLLLCLLLRLLLLCLLLR DLLDLLLLDLLLLDLLLLD
RCL1	9	RLLLCLLLRLLLLCLLLR
RCL2	10	RLLLCLLLRLLLLCLLLRLL
RCL3	11	RLLLCLLLRLLLLCLLLRLLLLCLLLR
KL8	12	KLLLLLLLLKLLLLLLLLKLL

KL7	13	KKLLLLLLLLKKLLLLLLLLKKL
-----	----	-------------------------

¹ Tên gọi là từ viết tắt cho trình tự gốc axit amin được chỉ ra

Các ví dụ về các phospholipit sử dụng trong các chế phẩm được phân phối theo sáng chế bao gồm các phospholipit tự nhiên và/hoặc tổng hợp. Các phospholipit có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không giới hạn, các phosphatidylcholin, các phosphatidylglycerol, các phosphatidyletanolamin, các phosphatidylserin, các axit phosphatidic, các phosphatidylinositol, các sphingolipit, các diacylglycerit, cardiolipin, các xeromit, các xerebrosit và các phospholipit tương tự. Các phospholipit ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn, dipalmitoyl phosphatidylcholin (DPPC), dilauryl phosphatidylcholin (DLPC) (C12:0), dimyristoyl phosphatidylcholin (DMPC) (C14:0), distearoyl phosphatidylcholin (DSPC), diphytanoyl phosphatidylcholin, nonadecanoyl phosphatidylcholin, arachidoyl phosphatidylcholin, dioleoyl phosphatidylcholin (DOPC) (C18:1), dipalmitoleoyl phosphatidylcholin (C16:1), linoleoyl phosphatidylcholin (C18:2), myristoyl palmitoyl phosphatidylcholin (MPPC), steroyl myristoyl phosphatidylcholin (SMPC), steroyl palmitoyl phosphatidylcholin (SPPC), palmitoyl oleoyl phosphatidylcholin (POPC), palmitoyl palmitoleoyl phosphatidylcholin (PPoPC), dipalmitoyl phosphatidyletanolamin (DPPE), palmitoyl oleoyl phosphatidyletanolamin (POPE), dioleoyl phosphatidyletanolamin (DOPE), dimyristoyl phosphatidyletanolamin (DMPE), distearoyl phosphatidyletanolamin (DSPE), dioleoyl phosphatidylglycerol (DOPG), palmitoyl oleoyl phosphatidylglycerol (POPG), dipalmitoyl phosphatidylglycerol (DPPG), dimyristoyl phosphatidylglycerol (DMPG), distearoyl phosphatidylglycerol (DSPG), dimyristoyl phosphatidylserin (DMPS), distearoyl phosphatidylserin (DSPS), palmitoyl oleoyl phosphatidylserin (POPS), lecithin đậu nành, lecithin lòng đỏ trứng, sphingomyelin, các phosphatidylinositol, diphosphatidylglycerol, phosphatidyletanolamin, các axit phosphatidic, và phosphatidylcholin ở trứng (EPC).

Các ví dụ về các axit béo và các alcohol béo sử dụng trong các hỗn hợp này bao gồm, nhưng không giới hạn, các sterol, axit palmitic, xetyl alcohol, axit lauric, axit myristic, axit stearic, axit phytanic, axit dipalmitic, và các chất tương tự. Tốt nhất là, axit béo là axit palmitic và alcohol béo là xetyl alcohol.

Các ví dụ về các este của axit béo sử dụng trong các hỗn hợp này bao gồm, nhưng

không giới hạn, methyl palmitat, ethyl palmitat, isopropyl palmitat, cholesteryl palmitat, palmityl palmitat natri palmitat, kali palmitat, tripalmitin, và các chất tương tự.

Các ví dụ về lipit tự nhiên bán tổng hợp hoặc biến đổi là lipit bất kỳ trong số các lipit được mô tả ở trên đã được biến đổi hóa học. Sự biến đổi hóa học có thể bao gồm một số biến đổi; tuy nhiên, biến đổi được ưu tiên là sự kết hợp của một hoặc nhiều nhóm polyetylen glycol (PEG) thành các phần mong muốn của lipit. Polyetylen glycol (PEG) đã được sử dụng rộng rãi trong vật liệu sinh học, công nghệ sinh học và y học chủ yếu bởi vì PEG là polyme có sự tương thích sinh học, không độc, không gây miễn dịch và tan trong nước. Trong lĩnh vực dẫn thuốc, các dẫn xuất PEG đã được sử dụng rộng rãi trong sự kết hợp cộng hóa trị (tức là, “PEG hóa”) với các protein để làm giảm phản ứng miễn dịch, phân giải protein và sự thanh thải của thận và để tăng độ hòa tan.

Các lipit đã được kết hợp với PEG ở đây được gọi là các “PEG-lipit”. Tốt hơn là, khi các PEG-lipit được sử dụng trong các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế, chúng có mặt trong các alcohol và/hoặc các aldehyt.

Các tá dược khác có thể được kết hợp với polipeptit hoạt động bề mặt trong phổi, một hoặc nhiều lipit, và hệ dung môi hữu cơ trước khi đông khô bao gồm, nhưng không giới hạn, nhiều chất đường khác nhau chẳng hạn như dextroza, fructoza, lactoza, maltoza, mannitol, sucroza, sorbitol, trehaloza, và các chất tương tự, các chất hoạt động bề mặt chẳng hạn như polysorbat-80, polysorbat-20, sorbitan trioleat, tyloxapol và các chất tương tự, các polyme chẳng hạn như PEG, dextran và các chất tương tự, các muối chẳng hạn như NaCl, CaCl₂ và các chất tương tự, các alcohol, chẳng hạn như xetyl alcohol, và các chất đệm.

Tốt nhất là, peptit hoạt động bề mặt trong phổi được kết hợp với các phospholipit và các axit béo hoặc các alcohol béo tự do, ví dụ, DPPC (dipalmitoyl phosphatidylcholin), POPG (palmitoyl-oleyl phosphatidylglycerol) và axit palmitic (PA). Tham khảo, ví dụ, patent Mỹ số 5,789,381 với sự bộc lộ của nó được kết hợp toàn bộ ở đây để tham khảo và cho mọi mục đích.

Bước thứ nhất trong việc chuẩn bị hỗn hợp tiền đông khô là để thu được hỗn hợp chất lỏng về cơ bản đồng nhất của peptit hoạt động bề mặt trong phổi, một hoặc nhiều

lipit, trong hệ dung môi hữu cơ chứa 93-100% dung môi hữu cơ, tốt hơn là etanol 95%. Cụm từ “về cơ bản đồng nhất”, có nghĩa là các thành phần được phân tán đồng nhất với nhau, ví dụ, như trong dung dịch. Các API được trộn lẫn trong hệ dung môi hữu cơ được đun nóng đến nhiệt độ $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ cho đến khi thu được dung dịch. Dung dịch thu được sau đó được lọc qua bộ lọc tiệt trùng (lỗ lọc 0,22 micromét) vào dung dịch đệm, tốt nhất là, dung dịch đệm tris(hydroxymetyl)aminometan (TRIS) được đun nóng đến nhiệt độ $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ và được khuấy để tạo ra hỗn hợp tiền đông khô ở dạng nhũ tương, có nồng độ của dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 3% đến 20% (thể tích/thể tích) tổng thể tích của hỗn hợp tiền đông khô, tốt hơn là từ 3% đến 15%, tốt hơn nữa là từ 5% đến 10% và tốt hơn nữa là từ 7% đến 10% với phần còn lại là nước và/hoặc chất đệm.

Theo các phương án ưu tiên nhất định, hỗn hợp của peptit hoạt động bề mặt trong phổi, các phospholipit và các axit béo và alcohol béo tự do, ví dụ, DPPC (dipalmitoyl phosphatidylcholin) và POPG (palmitoyl-oleyl phosphatidylglycerol) và axit palmitic (PA) được kết hợp với hệ dung môi hữu cơ để tạo ra hỗn hợp lỏng về cơ bản đồng nhất. Các thành phần cụ thể có thể có mặt trong hỗn hợp với nồng độ bất kỳ. Tổng nồng độ của phospholipit trong hệ phân tán có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ 1 đến 80mg tổng hàm lượng phospholipit/ml. Các chất đệm thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn, tris axetat, tris hydroclorua, natri phosphat, kali phosphat, và các chất đệm tương tự. Các chất đệm thường có sẵn trên thị trường.

Theo phương án ưu tiên, nhũ tương để sử dụng trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm DPPC, POPG, PA và KL4 (tỷ lệ trọng lượng xấp xỉ 7,5 : 2,5 : 1,35 : 0,267) trong dung môi có thể chấp nhận được về mặt sinh lý học có nồng độ dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 3% đến 20% (thể tích/thể tích) tổng thể tích của hỗn hợp tiền đông khô, tốt hơn là từ 3% đến 15%, tốt hơn nữa là từ 5% đến 10% và tốt hơn nữa là từ 7% đến 10% với phần còn lại là nước và/hoặc chất đệm.

Theo các phương án nhất định, hệ dung môi hữu cơ còn bao gồm các tá dược bổ sung, bao gồm, nhưng không giới hạn, các chất đường khác nhau chẳng hạn như đextroza, fructoza, lactoza, maltoza, mannitol, sucroza, sorbitol, trehaloza, và các chất tương tự, các chất hoạt động bề mặt chẳng hạn như, ví dụ, polysorbat-80, polysorbat-20, sorbitan trioleat, tyloxapol và các chất tương tự, các polyme chẳng hạn như PEG, dextran và các

polyme tương tự, các muối chẳng hạn như NaCl, CaCl₂, và các chất đệm. Theo các phương án ưu tiên nhất định, hệ dung môi hữu cơ về cơ bản không chứa muối. Theo các phương án ưu tiên nhất định, hệ dung môi hữu cơ về cơ bản không chứa NaCl.

Theo các phương án nhất định, hệ dung môi hữu cơ có thể được điều chế bằng cách kết hợp tất cả các thành phần trong hệ thống. Ví dụ, theo các phương án nhất định trong đó dung môi hữu cơ gồm có dung môi hữu cơ và môi trường nước ở nhiệt độ phòng, môi trường nước và dung môi hữu cơ có thể được kết hợp để tạo ra hệ dung môi hữu cơ. Tốt hơn là, hệ dung môi hữu cơ là nhũ tương hoặc dung dịch trộn lẫn.

Dung môi hữu cơ được chọn thích hợp là có thể tương thích với việc lọc vô trùng và đông khô. Tốt hơn là, các dung môi hữu cơ theo sáng chế được chọn từ nhóm gồm có các oxyhydrocarbon thấp, các halohydrocarbon thấp, các haloxyhydrocarbon thấp, các sulfoxyhydrocarbon thấp, các xyclohydrocarbon thấp và các sự kết hợp của chúng.

Các dung môi hữu cơ thích hợp để sử dụng theo sáng chế, bao gồm, nhưng không giới hạn, isopropyl alcohol, metanol, etanol, axeton, axetonitril, xyclohexan, clobutanol, dimethylsulfoxit, t-butanol, hexanol, benzyl alcohol, axit axetic, pentanol (1-pentanol), n-butanol, n-propanol, metyl axetat, dimethyl carbonat, metyl etyl xeton, metyl isobutyl xeton, carbon tetrachlorua, hexafluoraxeton, clobutanol, dimethyl sulfon, xyclohexan, và các sự kết hợp của chúng. Các dung môi thích hợp bao gồm các alkanol thấp, chẳng hạn như t-butanol, etanol, isopropyl alcohol, và các dung môi tương tự. Dung môi được ưu tiên cụ thể theo sáng chế là etanol.

Theo các phương án ưu tiên nhất định, chế phẩm chất hoạt động bề mặt trong phổi là lucinactant hoặc chế phẩm chất hoạt động bề mặt trong phổi khác bao gồm peptit hoạt động bề mặt tổng hợp KLLLLKLLLLKLLLLKLLLLK (KL4; mã nhận dạng trình tự số 1). Theo các phương án ưu tiên nhất định, chất hoạt động bề mặt trong phổi dạng đông khô theo sáng chế khi được khôi phục sẽ tạo ra sự kết hợp của các API: DPPC, POPG, PA và peptit KL4 với tỷ lệ trọng lượng xấp xỉ 7,5 : 2,5 : 1,35 : 0,267 hoặc với cùng tỷ lệ trọng lượng đối với chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp lỏng SURFAXIN[®] (lucinactant) của Discovery Laboratories, Inc. (Warrington, PA, USA). Theo các phương án nhất định, chế phẩm chất hoạt động bề mặt trong phổi được tạo chế phẩm ở các nồng độ, ví dụ, 10,

20, và 30mg/ml hàm lượng phospholipit. Theo các phương pháp khác, chế phẩm chất hoạt động bề mặt trong phổi được tạo chế phẩm ở các nồng độ lớn hơn, ví dụ, 60, 90, 120mg/ml hàm lượng phospholipit hoặc cao hơn, với tăng đồng thời nồng độ KL4.

Theo các phương án ví dụ nhất định của sáng chế, các lượng tương đối của peptit hoạt động bề mặt trong phổi, các phospholipit và các axit béo hoặc alcohol béo tự do là khoảng 1 phần trọng lượng của peptit hoạt động bề mặt tổng hợp; khoảng từ 20 đến 150 phần trọng lượng phospholipit trên mỗi phần trọng lượng peptit hoạt động bề mặt tổng hợp; khoảng từ 0 đến 25 phần trọng lượng axit béo hoặc alcohol béo tự do trên mỗi phần trọng lượng peptit hoạt động bề mặt tổng hợp. Theo các phương án nhất định, lượng tương đối của hệ dung môi hữu cơ là nằm trong khoảng từ 62,5 đến 250 phần trọng lượng trên mỗi phần trọng lượng peptit hoạt động bề mặt trong phổi. Theo các phương án nhất định, hệ dung môi hữu cơ có mặt với lượng từ 80 đến 125 phần trọng lượng trên mỗi phần trọng lượng của peptit hoạt động bề mặt trong phổi. Theo các phương án ví dụ nhất định, các lượng tương đối của peptit hoạt động bề mặt trong phổi, phospholipit và axit béo hoặc alcohol béo tự do là khoảng 1 phần trọng lượng của peptit hoạt động bề mặt trong phổi, chẳng hạn như, ví dụ, KL4; khoảng từ 20 đến 100 phần trọng lượng DPPC; từ 0 đến khoảng 50 phần trọng lượng POPG; và khoảng từ 0 đến 25 phần trọng lượng axit palmitic.

Vật liệu đông khô theo sáng chế có màu trắng, được phân tán không đồng đều trong các lọ, vật hình trụ (tức là, bất chước hình dáng của lọ), hóa rắn, có độ co nhỏ tối thiểu khi so sánh với chất nạp ban đầu, có kết cấu cứng sao cho không thể di chuyển khi đảo ngược lọ, và không có các vết vật liệu hoặc vòng ở trên bề mặt trên của vật liệu. Chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô theo sáng chế được điều chế theo phương pháp được mô tả ở trên có diện tích bề mặt riêng lớn hơn (ít nhất là 2,2 m²/g) và diện tích mao quản tổng cộng lớn (ít nhất là 40%) hơn so với các chất hoạt động bề mặt trong phổi được điều chế bằng các phương pháp đông khô khác. Tốt hơn là, diện tích bề mặt riêng của chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô theo sáng chế là nằm trong khoảng từ khoảng 3,7 m²/g đến 2,2 m²/g. Đã phát hiện được rằng bên cạnh sử dụng bước ủ để tạo ra kết cấu bánh đông khô cứng hơn, sự thay đổi về độ chân không, trong khi sấy sơ cấp cũng làm ảnh hưởng đến diện tích bề mặt riêng. Dữ liệu BET được nêu ra trong ví dụ 15 thể hiện rằng ở áp suất 40 micron, diện tích bề mặt riêng là lớn nhất

khi so sánh với diện tích bề mặt riêng của các mẫu được tạo ra ở áp suất 150 micron. Phát hiện này sẽ còn giúp cho việc xác định kết cấu của bánh chất hoạt động bề mặt trong phối tổng hợp dạng đông khô.

Vật liệu đông khô trải qua sự kiểm tra về độ ẩm còn lại, thời gian phục hồi, độ pH, độ nhớt và hoạt tính sinh học của nó. Vật liệu đông khô được phục hồi với 10 ml nước vô trùng dùng để tiêm (WFI) và các chất rắn được phân tán trong thời gian từ 20 đến 30 giây. Độ pH nằm trong khoảng từ 7,6 đến 7,9. Độ nhớt đo được bằng cách sử dụng nhớt kế Brookfield, Model LVDV-II ở nhiệt độ 37°C (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA) nằm trong khoảng 77-105 cP (0,077-0,105 Pas). Các mẫu được phân tích bằng thiết bị đo Pulsating Bubble Surfactometer (PBS) Model EC-PBS-B (Electronetics Corporation, USA, hiện nay là General Transco Inc., Largo, FL) ở nhiệt độ 37°C đối với khả năng làm giảm sức căng bề mặt (ví dụ, hoạt tính sinh học); các số đo về sức căng bề mặt trung bình nằm trong khoảng từ 2 đến 7 dyn/cm (từ 2×10^{-3} đến 7×10^{-3} N/m). Giá trị có thể chấp nhận được đối với chất hoạt động bề mặt trong phối có hiệu quả là dưới 10 dyn/cm (0,01N/m).

Một cách để đánh giá vật liệu đông khô là đo diện tích bề mặt riêng của nó. Diện tích bề mặt riêng là số đo bề mặt lộ ra của mẫu chất rắn theo tỉ lệ phân tử. Phương pháp phân tích diện tích bề mặt BET (Brunauer Emmet and Teller) là mô hình được thiết lập được sử dụng để xác định diện tích bề mặt riêng của các chất rắn bởi sự hấp phụ vật lý của các phân tử khí (tham khảo Dược điển Mỹ (U.S. Pharmacopeia), Mục : <846> Diện tích bề mặt riêng (Specific Surface Area) (http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c846.html)). Các mẫu thường được chuẩn bị bằng cách nung nóng trong khi hút chân không tức thời hoặc thổi khí lên trên mẫu để loại bỏ các tạp chất bị tách ra. Các mẫu chuẩn bị sau đó được làm lạnh bằng nitơ lỏng hoặc krypton và được phân tích bằng cách đo thể tích khí bị hấp phụ ở các áp suất cụ thể. Các thử nghiệm 11 điểm BET được tiến hành trên các mẫu được chọn bởi phòng thí nghiệm Micromeritics Pharmaceutical Services (Norcross, GA) sử dụng các chương trình ASAP® 2420 Accelerated Surface Area và Porosimetry System (Micromeritics Instruments Co., Norcross, GA). Các mẫu được xả khí ở nhiệt độ 25°C trong thời gian 16 giờ dưới chân không. 100% krypton được sử dụng dưới dạng chất bị hấp phụ. Nhiệt độ mề

phân tích là khoảng 77K. Các tham số sau đây được đo lại: Khối lượng mẫu (g), không gian tự do lạnh (cm^3), không gian tự do ẩm (cm^3), áp suất bão hòa (P_o) (mm Hg), áp suất tuyệt đối (P) (mm Hg), và thời gian. Các đồ thị tuyến tính đẳng nhiệt được tính toán cho mỗi mẫu, trong đó trục Y là lượng được hấp phụ ($\text{cm}^3/\text{g STP}$) và trục X là áp suất tương đối (P/P_o). STP được biết đến là nhiệt độ và áp suất tiêu chuẩn, tức là nhiệt độ 273,15 K và áp suất khí quyển ($1,013 \times 10^5 \text{ Pa}$). Dữ liệu được thể hiện trong các ví dụ dưới đây.

Tham số khác hữu ích trong xác định hình thái học của vật liệu đông khô là độ xốp của nó được xác định dưới dạng tỷ số thể tích của tất cả mao quản trên vật liệu so với thể tích của vật liệu. Độ xốp của vật liệu đông khô được xác định sử dụng kính hiển vi quét điện tử (SEM) JEOL 6480 Scanning Electron Microscope (JEOL, Japan). Các mẫu được lấy ra khỏi các lọ bằng cách cắt đỉnh lọ bằng dao cắt kim cương và cắt một nửa bề ngang của chúng. Các mặt cắt ngang của các mẫu cắt được đặt trong bộ SEM và được quan sát ở độ khuếch đại (X) là 20 và 100. Phân tích được thực hiện dưới áp suất chân không ở nhiệt độ phòng. Diện tích bề mặt ở độ khuếch đại X20 là xấp xỉ 6,4mm x 5,1 mm. Diện tích bề mặt ở độ khuếch đại X100 là xấp xỉ 1.200 μm x 965 μm .

Các ảnh chụp hiển vi SEM của các phần cắt ngang cho thấy vi mao quản hoặc cấu trúc xốp trên toàn bộ mặt cắt ngang của mỗi mẫu. Hai điểm tiêu biểu được lựa chọn để chụp ảnh là: đỉnh của bánh đông khô (vùng không bị cắt) là “bề mặt A” và bên trong bánh đông khô là “bề mặt B”. Fig.3A và Fig.3B thể hiện các ảnh phóng đại của chất hoạt động bề mặt trong phối dạng đông khô theo sáng chế được đóng trong các lọ 30 ml, ở độ khuếch đại X20, bề mặt A và bề mặt B tương ứng. Fig.4A và Fig.4B thể hiện các ảnh phóng đại của chất hoạt động bề mặt trong phối dạng đông khô chế phẩm II do Bornstein Lyo Cycle sản xuất trong các lọ 30 ml như được mô tả trong ví dụ 3, ở độ khuếch đại X20, bề mặt A và bề mặt B, tương ứng. Fig.5A và Fig.5B thể hiện các ảnh phóng đại của chất hoạt động bề mặt trong phối dạng đông khô theo sáng chế được đóng trong các lọ 30 ml, ở độ khuếch đại X100, bề mặt A và bề mặt B, tương ứng. Fig.6A và Fig.6B thể hiện các ảnh phóng đại của chất hoạt động bề mặt trong phối dạng đông khô chế phẩm II do Bornstein Lyo Cycle sản xuất trong các lọ 30 ml như được mô tả trong ví dụ 3, ở độ khuếch đại X100, bề mặt A và bề mặt B, tương ứng.

Đáng chú ý, chế phẩm III (A0490-62) được sản xuất như được mô tả trong ví dụ 4

sử dụng quy trình “Johnson Lyo Cycle” có thể không được phân tích với SEM do tính dễ vỡ của nó. Bánh đông khô không chịu được ngay cả khi cắt ở áp lực nhẹ và vỡ thành từng mảnh. So sánh tổng diện tích mao quản của chế phẩm I (A0490-55) được tạo ra như được mô tả trong ví dụ 2 sử dụng quy trình Novel Lyo Cycle với tổng diện tích mao quản của chế phẩm II (A0490-58) được tạo ra như được mô tả trong ví dụ 3 sử dụng quy trình “Bornstein Lyo Cycle”, quan sát được rằng chế phẩm I xốp hơn với độ chênh lệch tuyệt đối ít nhất là 11%.

Phần mềm MOTIC® Images Plus 2.0 (Motic Group Co., Ltd, Xiamen, China) dùng cho kính hiển vi được sử dụng để đánh giá vùng hở trong ảnh được chọn. Bộ lọc địa hình được áp dụng để đánh dấu các vùng hở và sau đó sử dụng các đặc tính phân đoạn tự động và tính toán tự động để tính toán diện tích bề mặt hở. Phương pháp này giảm tối thiểu thao tác thủ công dữ liệu và các độ sai lệch được loại bỏ giữa các hình ảnh được so sánh. Với chế phẩm I, các vùng mao quản cấu thành nên 49,1% vùng được đo đối với mặt trên của mẫu (bề mặt A) và 50,5% vùng được đo đối với bên trong bánh đông khô (bề mặt B). Với chế phẩm II, các vùng mao quản cấu thành nên 37,3% vùng được đo đối với mặt trên của mẫu (bề mặt A) và 36,7% vùng được đo đối với bên trong bánh đông khô (bề mặt B). Các độ chênh lệch tương ứng là 11,8% và 13,8%.

Việc tính toán mao quản thủ công được tiến hành để thử nghiệm độ chính xác của phương pháp nêu trên đối với các mẫu được thể hiện trên Fig.5A (công thức I, bề mặt A, X100) và Fig.6A (công thức II, bề mặt A, X100). Mỗi ảnh hiển vi được cắt thành kích thước 6,4 mm (rộng) và 3,9 mm (cao), và 20 “mao quản” được đo chiều cao và độ rộng trong mỗi ảnh và so sánh.

Chế phẩm chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô theo sáng chế có sự kết hợp đồng nhất của diện tích bề mặt lớn (ít nhất là $2,7 \text{ m}^2/\text{g}$), độ xốp lớn (trên 40% thể tích) và độ cứng đã được chứng minh, ví dụ, khả năng chống lại di chuyển khi đảo ngược và cũng không di chuyển khi đồ chứa vật liệu được gõ nhẹ. Khối cứng hơn có thể liên quan đến độ di động phân tử giảm, tiền chất của các phản ứng hóa học, và do đó sản phẩm ổn định hơn.

Đã quan sát được từ trước là ngoài bốn API, sinapultit hoặc peptit KL4 thoái biến

nhanh hơn trong môi trường lỏng so với trạng thái rắn như vật liệu đông khô (xem patent Mỹ số 5,952,303 cấp cho Bornstein). Dựa vào kỳ vọng là sự đồng đều của chế phẩm đông khô cũng là biểu hiện của sản phẩm ổn định hơn, các tác giả thấy trước được rằng chế phẩm đông khô thu được bởi phương pháp theo sáng chế được mô tả ở đây sẽ chứng minh độ ổn định được cải thiện ít nhất là đối với peptit KL4 với thời gian lưu trữ ít nhất là 3 tháng ở nhiệt độ 25°C. Cũng có kỳ vọng rằng trong thời gian lưu trữ dài hơn, ví dụ, 6 tháng và 9 tháng ở 25°C và cũng như nếu được lưu trữ ở các nhiệt độ cao hơn, ví dụ, 30°C và 40°C, độ ổn định của KL4 và các API khác sẽ tốt hơn đáng kể đối với chế phẩm đông khô thu được bởi phương pháp theo sáng chế khi so sánh với chế phẩm đông khô được tạo ra bởi các quy trình đông khô khác. Các độ cải thiện độ ổn định được kỳ vọng là ít nhất trên 2%, ít nhất trên 5% hoặc ít nhất trên 10%.

Các chất hoạt động bề mặt trong phối dạng đông khô theo sáng chế có thể được khôi phục với nước hoặc các tá dược hòa tan khác. Việc sử dụng các chất hoạt động bề mặt trong phối, dạng lỏng hoặc đông khô, đã được mô tả từ trước. Các chất hoạt động bề mặt trong phối dạng đông khô mới thể hiện sự đóng bánh rất tốt và độ ổn định rất tốt để chống lại sự di chuyển và nổi lên, là các thuộc tính cần thiết đối với sản phẩm dược phẩm.

Sáng chế sẽ được minh họa chi tiết hơn nhờ các ví dụ sau đây, nhưng cần hiểu rằng sáng chế không bị giới hạn ở các ví dụ này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1

Quá trình đông khô được thực hiện sử dụng quy trình mới và các quy trình được công bố từ trước được mô tả trong các Patent Mỹ số 5,952,303 và 7,582,312 để chứng minh các khác biệt được đưa ra bởi mỗi quy trình trên sản phẩm đông khô thu được.

Vật liệu: Các thành phần trong các chế phẩm được đông khô bởi mỗi quy trình trong số ba quá trình này được tóm tắt dưới đây trong bảng 1. Các lượng thực tế được điều chỉnh tùy theo độ tinh khiết của nguyên liệu.

Bảng 1. Nguyên liệu thô dùng cho các chế phẩm I, II, và III (dung tích mẻ 3000 g)

Nguyên liệu	Lượng (mg) trên mỗi gam chế phẩm	Lượng (mg) trên mỗi mẻ
KL ₄ (API)	0,74mg	2,22g
DPPC (API)	18,00mg	54,00g
POPG, Na (API)	5,82mg	17,47g
PA (API)	3,113mg	9,38g
Etanol 95%	0,105mg	316g
Đệm:		
NaCl	5,83mg	17,49g
Tromethamin	1,86mg	5,57g
Nước	0,859 g	2578g

Tiến hành: hai mẻ 3000 được chuẩn bị cho mỗi quy trình. Xylanh được sử dụng để nạp trọng lượng tiêu chuẩn là 13,7 gram mỗi lọ. Chuẩn bị hỗn hợp tiền đông khô: các nguyên liệu API được hòa tan trong etanol 95% ở nhiệt độ $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ để thu được dung dịch. Dung dịch thu được được lọc vô trùng sử dụng áp suất qua màng lọc đường kính 33mm có kích thước lỗ lọc 0,22 micromet vào dung dịch đệm tris(hydroxymetyl)aminometan (TRIS) đang khuấy ở nhiệt độ $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ để tạo ra một chế phẩm lyposom với nồng độ etanol cuối cùng là 10% (trọng lượng/trọng lượng). Sau khi làm mát đến nhiệt độ dưới 30°C , chế phẩm lyposom thu được, tức là, hỗn hợp tiền đông khô, được chuyển vào các đồ chứa chất đông khô bằng thủy tinh borosilicat dung tích 20, 30 và 50 ml ở thể tích chứa là 13,7 g/lọ. Vật liệu đông khô thu được được bảo quản ở nhiệt độ 5°C .

Ví dụ 2

Chế phẩm I. Hỗn hợp tiền đông khô từ bảng 1 được sử dụng để nạp vào các lọ thủy tinh dung tích 20, 30 và 50 mL và được làm đông khô sử dụng phương pháp đông khô mới được mô tả ở trên. Bảng 2 tóm lược các tham số của quy trình đông khô.

Bảng 2. Các tham số của quy trình đông khô mới

Giai đoạn của quy trình đông khô	Bước	Tham số
Giai đoạn bắt đầu *	Nhiệt độ giá đỡ ban	5°C . được giữ trong thời gian 2

	đầu:	giờ
Giai đoạn đông băng *	Bước làm lạnh	-20°C ở tốc độ 1,0°C/phút
	Bước làm lạnh	-30°C ở tốc độ 0,5°C/phút
	Bước làm lạnh	-40°C ở tốc độ 0,25°C/phút
	Bước làm lạnh	-50°C ở tốc độ 0,10°C/phút
	Bước giữ	-50°C trong thời gian 4 giờ
Giai đoạn ủ*	Bước làm nóng	-22°C ở tốc độ 0,5°C/phút
	Bước ủ	-22°C trong thời gian 4 giờ
	Bước làm lạnh	-30°C ở tốc độ 0,5°C/phút
	Bước làm lạnh	-40°C ở tốc độ 0,25°C/phút
	Bước làm lạnh	-50°C ở tốc độ 0,10°C/phút
	Bước giữ	-50°C trong thời gian 4 giờ
Giai đoạn sấy sơ cấp**	Độ chân không:	40 mT
	Bước giữ	-50°C trong thời gian 1 giờ
	Bước làm nóng	-25°C ở tốc độ 0,10°C/phút
	Bước giữ	-25°C trong thời gian 100 giờ
Giai đoạn sấy thứ cấp **	Bước làm nóng	25°C ở tốc độ 0,5°C/phút
	Bước giữ	25°C trong thời gian 6 giờ
Giai đoạn hoàn thiện **	Xúc rửa ngược:	N ₂ đến ½ bar trước khi hàn kín lọ

* Giai đoạn được thực hiện ở áp suất khí quyển. ** Giai đoạn được thực hiện trong chân không.

Ví dụ 3

Chế phẩm II. Hỗn hợp tiền đông khô từ bảng 1 được sử dụng để nạp vào các lọ thủy tinh dung tích 20, 30 và 50 mL và được đông khô sử dụng phương pháp đông khô được mô tả trong patent Mỹ số 5,952,303 cấp cho Bornstein (“Bornstein Lyo Cycle”). Bảng 3 tóm lược các tham số của quy trình này.

Bảng 3. Các tham số đông khô của quy trình Bornstein Lyo Cycle

Nhiệt độ giá đỡ ban đầu*:	25°C.
Bước làm lạnh*	-40°C ở tốc độ 1,0°C/phút
Bước giữ*	-40°C trong thời gian 2 giờ
Độ chân không:	100 mT
Bước làm nóng**	0°C ở tốc độ 0,5°C/phút
Bước giữ**	0°C trong thời gian 48 giờ
Bước làm nóng**	26°C ở tốc độ 0,5°C/phút
Bước giữ**	26°C trong thời gian 12 giờ
Xúc rửa ngược**:	N ₂ đến ½ bar trước khi hàn kín lọ

* Giai đoạn được thực hiện ở áp suất khí quyển.

** Giai đoạn được thực hiện trong chân không.

Ví dụ 4

Chế phẩm II. Hỗn hợp tiền đông khô từ bảng 1 được sử dụng để nạp vào các lọ thủy tinh dung tích 20, 30 và 50 mL và được đông khô sử dụng phương pháp đông khô được mô tả trong patent Mỹ số 7,582,312 cấp cho (“Johnson Lyo Cycle”). Bảng 4 tóm lược các tham số của quy trình này.

Bảng 4. Các tham số đông khô của quy trình Johnson Lyo Cycle

Nhiệt độ giá đỡ ban đầu*:	25°C.
Bước làm lạnh*	-30°C ở tốc độ 1,0°C/phút
Bước giữ*	-30°C cho đến khi các lọ thủy tinh đạt đến nhiệt độ mong muốn
Độ chân không:	500 mT
Bước làm nóng**	0°C ở tốc độ 1°C/phút
Bước giữ**	Giữ cho đến khi các lọ thủy tinh đạt đến nhiệt độ mong muốn
Xúc rửa ngược**:	N ₂ đến ½ bar trước khi hàn kín lọ

* Giai đoạn được thực hiện ở áp suất khí quyển.

** Giai đoạn được thực hiện trong chân không.

Ví dụ 5

Đánh giá hình dáng tự nhiên của vật liệu đã đông khô. 20 lọ đã được lựa chọn ngẫu nhiên. Các lô 55-20, 55-30 và 55-50 tương ứng với chế phẩm I trong các lọ dung tích 20, 30 và 50 ml tương ứng. Các lô 58-20, 58-30 và 58-50 tương ứng với chế phẩm II trong các lọ dung tích 20, 30 và 50 ml tương ứng. Các lô 62-20, 62-30 và 62-50 tương ứng với chế phẩm III trong các lọ dung tích 20, 30 và 50 ml tương ứng. Tất cả các biến thứ bậc được tóm lược sử dụng tần suất và phần trăm khi thích hợp. Tất cả các biến liên tục được tóm lược bằng cách sử dụng giá trị trung bình và độ lệch chuẩn (Standard Deviation- SD), với giá trị trung bình và khoảng (tối thiểu, tối đa) được sử dụng cho các mức đánh giá được lựa chọn. Các chế phẩm I, II và III được đông khô trong các lọ dung tích 20, 30 và 50 ml đã được kiểm tra bằng mắt đối với các dấu hiệu của sự nổi lên chẳng như vòng màu trắng ở trên chiều cao nạp liệu ban đầu. Đối với lọ 20 ml, chiều cao nạp chất lỏng là 25mm, với lọ 30 ml, chiều cao nạp chất lỏng là 20 mm, và với lọ 50 ml, chiều cao nạp chất lỏng là 15 mm.

Phép đo khoảng cách nổi lên thực tế và phép đo từ đáy lọ đến vòng trắng ở trên chiều cao nạp liệu ban đầu trừ đi chiều cao nạp liệu ban đầu đã được thực hiện và được minh họa trong bảng 5 và Fig.2

Bảng 5

Chiều cao nổi, mm									
Số lượng lọ	Lô số 62-20	Lô số 62-30	Lô số 62-50	Lô số 58-20	Lô số 58-30	Lô số 58-50	Lô số 55-20	Lô số 55-30	Lô số 55-50
1	11	4	0	3	4	4	1	0	0
2	6	4	0	2	5	0	1	0	0
3	15	4	0	3	3	5	0	0	0
4	7	5	0	2	3	3	0	0	0
5	20	4	4	2	3	3	0	0	0
6	10	6	5	2	3	4	0	0	0
7	7	3	4	3	4	3	0	0	0
8	12	5	7	3	4	4	2	0	0

9	14	5	4	4	4	4	1	0	0
10	8	4	3	3	3	3	2	0	0
11	10	5	5	4	2	3	0	0	0
12	10	5	6	5	3	0	0	0	0
13	9	4	5	4	3	2	0	0	0
14	12	4	5	3	4	1	0	0	0
15	8	6	10	3	2	3	1	0	0
16	4	5	5	3	3	0	1	0	0
17	11	3	2	4	2	3	0	0	0
18	9	5	3	4	3	2	0	0	0
19	10	5	2	4	2	2	0	0	0
20	8	5	4	3	3	2	0	0	0

Các mẫu chế phẩm I (các lô 55-30 và 55-50) (chất hoạt động bề mặt trong phối dạng đông khô theo sáng chế) trong các lọ 30 và 50 ml không có dấu hiệu nổi lên trong khi các mẫu trong các lọ 20 ml (lô 55-20), có sự nổi lên nhẹ đến 2 mm với 7 trong số 20 mẫu. Các mẫu chế phẩm II (58-20, 58-30 và 58-50) trong cả ba kích thước này cũng như các mẫu chế phẩm III (62-20, 62-30 và 62-50), với các mẫu chế phẩm III trong các lọ 20 ml là tồi tệ nhất, tất cả đều có dấu hiệu nổi lên trong quy trình đông khô. Rõ ràng, bằng cách sử dụng quy trình đông khô mới, vấn đề nổi lên đã được giảm đáng kể hoặc loại bỏ.

20 lọ được lựa chọn ngẫu nhiên của chế phẩm I, II và III được đông khô trong các lọ 20, 30 và 50 ml đã được kiểm tra để kiểm tra các dấu hiệu của sự di chuyển khi đảo ngược bằng cách đảo ngược lọ một lần. Fig.1 là biểu đồ cột thể hiện số lượng đồ chứa vật liệu đông khô di chuyển khi đảo ngược (được thể hiện dưới dạng các cột màu đen) và số lượng đồ chứa vật liệu đông khô không di chuyển khi đảo ngược (được thể hiện dưới dạng các cột được gạch chéo). Không có mẫu nào trong số các mẫu chế phẩm I (chất hoạt động bề mặt trong phối dạng đông khô theo sáng chế) di chuyển khi đảo ngược, trong khi tất cả các mẫu chế phẩm III và hầu hết các mẫu chế phẩm II di chuyển. Thử nghiệm này đã chứng minh rằng chất hoạt động bề mặt trong phối dạng đông khô theo sáng chế có sự định vị tốt trong các lọ so với các mẫu khác.

Ví dụ 6

Các nghiên cứu được đề xuất đối với độ ổn định và hiệu lực của các API. Bốn API, KL4 (sinapultide), DPPC, POPG và axit palmitic (PA), sẽ được thử nghiệm tính toàn vẹn trong khoảng thời gian được chọn, trong vòng từ 3 đến 12 tháng lưu trữ ở nhiệt độ 25°C, 30°C hoặc 40°C sử dụng HPLC (High Performance Liquid Chromatography - Sắc ký lỏng hiệu năng cao). Các thông số HPLC được thể hiện trong bảng 6.

Bảng 6: Các điều kiện sắc ký

Thiết bị:	HPLC (Waters ALLIANCE®, Waters Corp, Milford, MA)
Cột:	Zorbax SB-C18 9 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 150 x 4,6 mm, kích thước hạt 3,5 micrômet hoặc cột tương đương có kích thước và pha tương tự
Nhiệt độ cột:	50°C
Tốc độ chảy:	0,8 mL/phút
Đầu dò:	Đầu dò sol khí Corona Plus (CAD); ESA Corona Plus CAD
Thể tích tiêm mẫu:	Ít nhất là 33µL
Nitơ (N ₂):	Bộ tạo dòng nitơ; thiết lập ở áp suất 35 psi
Pha di động A:	Metanol:Nước:Axit trifloraxetic (50,0:50,0:0,8, thể tích/thể tích/thể tích)
Pha di động B:	Isopropanol:Metanol:Tetrahydrofuran:Axit trifloaxetic (70:15:15:0,8, thể tích/thể tích/thể tích)

Các tiêu chuẩn bao gồm mỗi trong số 4 API được chạy để xác định mô hình rửa giải. Các mẫu được nạp vào cột và số lượng API được tính toán.

Ví dụ 7

Các chế phẩm I, II và III trong các lọ 20, 30 và 50 ml phải trải qua thử nghiệm BET đồng thời. Đáng chú ý, khi các chế phẩm I, II và III được gửi đến Micromeritics qua FEDEX, để qua đêm, để thử nghiệm BET, chế phẩm III không được giao nguyên vẹn, bánh đông khô rõ ràng đã bị vỡ vụn, và do đó, không thể thực hiện thử nghiệm. Vật liệu được gửi lại sử dụng bao gói đảm bảo hơn và các mẫu trong các lọ 50ml (62-50) vẫn bị vỡ vụn. Như thế, các kết quả thử nghiệm đối với mẫu 62-50 sẽ không cho kết quả chính xác.

Thử nghiệm BET được thực hiện như sau: Phân tích hấp phụ: Kr; Hiệu chỉnh nhiệt: Có; Khoảng thời gian cân bằng: 10 giây; Nhiệt độ môi trường: 22,00°C; Khử khí tự động: Có. Các kết quả cho vật liệu đông khô theo sáng chế (chế phẩm I) trong các lọ 20ml, 30ml và 50 ml được thể hiện trong bảng 7. Các kết quả cho các chế phẩm II và III được thể hiện trong bảng 8.

Bảng 7

Tham số	Mẫu: 55-20 Chế phẩm I, trong các lọ 20ml	Mẫu: 55-30 Chế phẩm I, trong các lọ 30ml	Mẫu: 55-50 Chế phẩm I, trong các lọ 50ml
Nhiệt độ mở phân tích	77,155 K	77,139 K	77,110 K
Khối lượng mẫu	0,3762g	0,4164g	0,1844g
Không gian tự do ấm đo được	27,7288 cm ³	27,4722 cm ³	28,0054 cm ³
Không gian tự do lạnh đo được	84,7298 cm ³	83,1997 cm ³	85,6894 cm ³
Diện tích bề mặt điểm đơn lẻ	Được đo ở P/Po = 0,241772386: 2,4402 m ² /g	Được đo ở P/Po = 0,239917356: 2,5954 m ² /g	Được đo ở P/Po = 0,243909821: 1,9668 m ² /g
Diện tích bề mặt BET	3,4203 m ² /g ± 0,0239 m ² /g	3,6868 ± 0,0194 m ² /g	2,7108 ± 0,0243 m ² /g
Độ dốc	1,438722 ± 0,011382 g/cm ³ STP	1,328621 ± 0,007963 g/cm ³ STP	1,825983 ± 0,018413 g/cm ³ STP
Mật phẳng chấn Y	0,211127 ± 0,001832 g/cm ³ STP	0,201998 ± 0,001275 g/cm ³ STP	0,255709 ± 0,003006 g/cm ³ STP
C	7,814496	7,577384	8,140860
Qm	0,6061 cm ³ /g STP	0,6533 cm ³ /g STP	0,4804 cm ³ /g STP
Hệ số tương quan	0,9997498	0,9998563	0,9995935
Vùng mặt cắt ngang phân tử	0,2100 nm ²	0,2100 nm ²	0,2100 nm ²

Bảng 8

	Chế phẩm II, 20ml	Chế phẩm II, 30ml	Chế phẩm II, 50ml	Chế phẩm III, 20ml	Chế phẩm III, 30ml
Diện tích bề mặt BET,	1,7613 ±	1,7663 ±	0,6462 ±	0,9445 ±	0,7282 ±

	Chế phẩm II, 20ml	Chế phẩm II, 30ml	Chế phẩm II, 50ml	Chế phẩm III, 20ml	Chế phẩm III, 30ml
m ² /g	0,0167 m ² /g	0,0193 m ² /g	0,0069 m ² /g	0,0061 m ² /g	0,0032 m ² /g
Qm, cm ³ /g STP	0,3121 cm ³ /g STP	0,3130 cm ³ /g STP	0,1145 cm ³ /g STP	0,1674 cm ³ /g STP	0,1291 cm ³ /g STP

Diện tích bề mặt riêng đối với các mẫu chế phẩm I nằm trong khoảng từ 3,7 m²/g đến 2,7 m²/g. Diện tích bề mặt riêng đối với các mẫu chế phẩm II là khoảng 1,7 m²/g. Diện tích bề mặt riêng đối với các mẫu chế phẩm III nằm trong khoảng từ 0,6 m²/g đến 0,9 m²/g. Rõ ràng là, diện tích bề mặt riêng đối với các mẫu chế phẩm I lớn hơn đáng kể so với các mẫu khác.

Ví dụ 8: Chế phẩm IV

Khi phối phục với 10 ml nước cất pha tiêm, chế phẩm IV đông khô sẽ cho nồng độ của các API như sau, như được thể hiện trong bảng 9:

Bảng 9

API	(mg/mL)
Sinapultit (KL ₄)	0,862
Axit palmitic	4,05
DPPC	22,50
POPG	7,50

Bảng 10. Nguyên liệu thô cho chế phẩm IV (Quy mô mẻ 8000g)

Nguyên liệu	Lượng (mg) trên mỗi gam chế phẩm	Lượng (g) trên mỗi mẻ
KL ₄ (API)	0,797mg	6,376g
DPPC (API)	17,99mg	143,9g
POPG, Na (API)	5,82mg	46,6g
PA (API)	3,11mg	24,88g
Etanol 95%		623,2g
Đệm TRIS:		
NaCl	5,83mg	46,64g
Tromethamin	1,86mg	14,88g
Nước		6074g

Một số mẻ được chuẩn bị theo bảng 10. Chuẩn bị hỗn hợp tiền đông khô: các API được hòa tan trong etanol 95% ở nhiệt độ $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ để thu được dung dịch. Dung dịch thu được được lọc hút qua màng lọc (PVDF) Millipore Millex GV cat. No SLGV033NS kích thước 33mm với lỗ lọc 0,22 micromét vào dung dịch đệm TRIS ở nhiệt độ $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ để thu được chế phẩm lyposom với nồng độ etanol cuối cùng là 7% (trọng lượng/trọng lượng). Sau khi để nguội đến nhiệt độ dưới 30°C , chế phẩm lyposom thu được, tức là, hỗn hợp tiền đông khô, được chuyển vào các lọ đông khô bằng thủy tinh borosilicat 30 mL ở thể tích nạp là 13,7 g/lọ sử dụng bơm nhu động và được đông khô như được mô tả trong các ví dụ từ 9 đến 14, các lần vận hành từ 1 đến 6.

Ví dụ 9

Lần vận hành 2

Bảng 11

Giai đoạn		Nhiệt độ	Áp suất	Thời hạn		Mô tả
		$^{\circ}\text{C}$	Micron	Giờ	Phút	
Nạp	1	5				Nhiệt độ nạp lên giá
Đóng băng	2	5		1	00	Giữ ở $5,0^{\circ}\text{C}$
	3	-45		4	10	Tăng dần ở tốc độ $0,2^{\circ}\text{C}/\text{phút}$
	4	-45		4	00	Giữ ở -45°C
	5	-22		1	55	Tăng dần ở tốc độ $0,2^{\circ}\text{C}/\text{phút}$
	6	-22		4	00	Giữ ở -22°C
	7	-45		4	40	Tăng dần ở tốc độ $0,1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$
Tạo chân không	1	-45	100	0	30	Hút chân không
Sấy sơ cấp	1	-5	100	3	20	Tăng dần ở tốc độ $0,2^{\circ}\text{C}/\text{phút}$
	2	-5	100	18	00	Giữ ở -5°C
Sấy thứ cấp	3	+25	100	2	30	Tăng dần ở tốc độ $0,2^{\circ}\text{C}/\text{phút}$
	4	+25	100	13	00	Giữ ở $+25^{\circ}\text{C}$ Thử nghiệm tăng áp suất 100μ
	5	+25	100	10	00	Giữ ở $+25^{\circ}\text{C}$
Đóng nắp 10,0 Psia						Kết thúc quy trình

Ví dụ 10

Lần vận hành 3

Bảng 12

Giai đoạn		Nhiệt độ	Áp suất	Thời hạn		Mô tả
		°C	Micron	Giờ	Phút	
Nạp	1	5				Nhiệt độ nạp lên giá
Đóng băng	1	5				Nhiệt độ nạp lên giá
	2	5		1	00	Giữ ở 5,0°C
	3	-45		4	10	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	4	-45		4	00	Giữ ở -45°C
	5	-22		1	55	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	6	-22		4	00	Giữ ở -22°C
	7	-45		4	40	Tăng dần ở tốc độ 0,1°C/phút
Tạo chân không	1	-45	150	0	30	Hút chân không
Sấy sơ cấp	1	0	150	3	45	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	2	0	150	18	00	Giữ ở 0°C
Sấy thứ cấp	3	+25	150	2	05	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	4	+25	150	13	00	Giữ ở +25°C Thử nghiệm tăng áp suất 100μ
	5	+25	150	10	00	Giữ ở +25°C
Đóng nắp 10,0 Psia						Kết thúc quy trình

Ví dụ 11

Lần vận hành 4

Bảng 13

Giai đoạn		Nhiệt độ	Áp suất	Thời hạn		Mô tả
		°C	Micron	Giờ	Phút	
Nạp	1	5				Nhiệt độ nạp lên giá
Đóng băng	2	5		1	00	Giữ ở 5,0°C

	3	-45		4	10	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	4	-45		4	00	Giữ ở -45°C
	5	-22		1	55	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	6	-22		4	00	Giữ ở -22°C
	7	-45		4	40	Tăng dần ở tốc độ 0,1°C/phút
Tạo chân không	1	-45	50	0	30	Hút chân không
Sấy sơ cấp	1	0	50	3	45	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	2	0	50	18	00	Giữ ở -0°C
Sấy thứ cấp	3	+25	50	2	05	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	4	+25	50	13	00	Giữ ở +25°C Thử nghiệm tăng áp suất 100μ
	5	+25	50	10	00	Giữ ở +25°C
Đóng nắp 10,0 Psia						Kết thúc quy trình

Ví dụ 12

Lần vận hành 5

Bảng 14

Giai đoạn		Nhiệt độ	Áp suất	Thời hạn		Mô tả
		°C	Micron	Giờ	Phút	
Nạp	1	5				Nhiệt độ nạp lên giá
Đóng băng	2	5		1	00	Giữ ở 5,0°C
	3	-45		4	10	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	4	-45		4	00	Giữ ở -45°C
	5	-22		1	55	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	6	-22		4	00	Giữ ở -22°C
	7	-45		4	40	Tăng dần ở tốc độ 0,1°C/phút
Tạo chân không	1	-45	50	0	30	Hút chân không
Sấy sơ cấp	1	-10	50	2	55	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	2	-10	50	18	00	Giữ ở -10°C
Sấy thứ cấp	3	+25	50	2	55	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	4	+25	50	13	00	Giữ ở +25°C Thử nghiệm tăng áp suất

					100μ
5	+25	50	10	00	Giữ ở +25°C
Đóng nắp 10,0 Psia					Kết thúc quy trình

Ví dụ 13

Lần vận hành 6

Bảng 15

Giai đoạn		Nhiệt độ	Áp suất	Thời hạn		Mô tả
		°C	Micron	Giờ	Phút	
Nạp	1	5				Nhiệt độ nạp lên giá
Đóng băng	2	5		1	00	Giữ ở 5,0°C
	3	-45		4	10	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	4	-45		4	00	Giữ ở -45°C
	5	-22		1	55	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	6	-22		4	00	Giữ ở -22°C
	7	-45		4	40	Tăng dần ở tốc độ 0,1°C/phút
Tạo chân không	1	-45	150	0	30	Hút chân không
Sấy sơ cấp	1	-10	150	2	55	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	2	-10	150	18	00	Giữ ở -10°C
Sấy thứ cấp	3	+25	150	2	55	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	4	+25	150	13	00	Giữ ở +25°C Thử nghiệm tăng áp suất 100μ
	5	+25	150	10	00	Giữ ở +25°C
Đóng nắp 10,0 Psia						Kết thúc quy trình

Ví dụ 14

Lần vận hành 1

Bảng 16

Giai đoạn		Nhiệt độ	Áp suất	Thời hạn		Mô tả
		°C	Micron	Giờ	Phút	
Nạp	1	5				Nhiệt độ nạp lên giá
Đóng băng	2	5		1	00	Giữ ở 5,0°C
	3	-15		1	40	Tăng dần ở tốc độ 0,1°C/phút
		-15		1	00	Giữ ở -15°C
	4	-45		5	00	Tăng dần ở tốc độ 0,1°C/phút
	5	-45		3	00	Giữ ở -45°C
Tạo chân không	1	-45	100	0	30	Hút chân không
Sấy sơ cấp	1	-5	100	3	20	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	2	-5	100	18	00	Giữ ở -5°C
Sấy thứ cấp	3	+25	100	2	30	Tăng dần ở tốc độ 0,2°C/phút
	4	+25	100	13	00	Giữ ở +25°C Thử nghiệm tăng áp suất 100μ
	5	+25	100	10	00	Giữ ở +25°C
Đóng nắp 10,0 Psia						Kết thúc quy trình

Ví dụ 15

Sản phẩm đông khô thu được từ các lần vận hành từ 1 đến 6 phải trải qua thử nghiệm BET đồng thời.

Thử nghiệm BET được thực hiện ở các tham số giống như đã được mô tả trong ví dụ 7 ở trên. Ba lọ từ mỗi lần vận hành được thử nghiệm. Các kết quả được thể hiện trong bảng 17.

Bảng 17

	Lọ 1 Diện tích bề mặt BET, m ² /g	Lọ 2 Diện tích bề mặt BET, m ² /g	Lọ 3 Diện tích bề mặt BET, m ² /g
Lần vận hành 1	2,8346	2,3442	2,81
Lần vận hành 2	2,811	2,2773	2,9054
Lần vận hành 3	2,3712	2,4207	2,2615
Lần vận hành 4	2,8611	3,0281	2,9269
Lần vận hành 5	2,7151	3,4333	3,2092
Lần vận hành 6	2,3428	2,4349	2,2654

Phương pháp:

Khôi phục: các yêu cầu của dung dịch khôi phục là không có chất không tan và dung dịch không kèm trong hơn so với chất hòa tan sau một thời gian định trước. Thử tích khôi phục có thể đưa sản phẩm trở lại thử tích và nồng độ không đổi như sản phẩm ban đầu khi nạp vào dung dịch dung dịch gộp và có thể có thử tích bằng thử tích được dự định tiêm cho bệnh nhân khi điều trị lâm sàng. Nước tinh khiết, USP dưới dạng chất hòa tan, ở thử tích 10ml được hút vào xylanh. Chất hòa tan sau đó được bơm vào tâm của bánh đồng khô và bắt đầu tính thời gian. Sau đó sản phẩm được kiểm tra ở các khoảng thời gian xấp xỉ 5 giây trong hộp sáng để xác định sự có mặt của chất không tan và độ trong của dung dịch. Dung dịch, ngay khi được khôi phục hoàn toàn, được đặc trưng là trong, không màu, mờ, đục và/hoặc vẫn đục. Các hạt, nếu có, được xếp loại là từ các chất không tan mịn tới các sợi thô. Các tá dược không hòa tan hoặc API được ghi chú như thông thường.

Đo độ pH – Các dung dịch đã khôi phục (xem ở trên) được đo độ pH theo Dược điển Mỹ USP<791>, pH. Sự chuẩn hóa với hai hoặc ba chất đệm pH gộp lại phạm vi mẫu kỳ vọng được thực hiện trước khi sử dụng. Các chất đệm pH được chọn là phần không lớn hơn ba đơn vị pH nhưng không nhỏ hơn hai đơn vị pH (ví dụ, 4,01; 7,00; và 10,01). Đầu dò ATC được sử dụng cho sự cân bằng nhiệt độ tự động. Lượng dung dịch mẫu đủ để bao hết cảm biến dò độ pH và mỗi nối chuyển bất kỳ trên cạnh của đầu dò được chuyển vào hộp đựng thích hợp. Dung dịch được tạo xoáy nhẹ và sau đó được để yên và ổn định đến giá trị không đổi trong khoảng thời gian ít nhất là 15 giây, tại điểm đó, giá trị độ pH hiển

thị được ghi lại.

Thử nghiệm chuẩn độ Karl- Fischer điện lượng - ẩm (Coulometric Karl Fischer Titration – Moisture) tiếp theo các phương pháp thông thường được chấp nhận rộng rãi được phác họa theo Dược điển Mỹ USP<921>, xác định nước. Mẫu khô ban đầu và đồ chứa được cân. Phương pháp chiết tách dung môi với metanol khan, chất phản ứng riêng, A.C.S được bơm vào đồ chứa được sử dụng để phân tán và hòa tan chất khô. Thể tích chiết metanol được sử dụng để bao chất khô là từ 13,0ml đến 13,7ml cho mỗi thử nghiệm. Các mẫu sau đó được ngâm trong một thời gian định trước để chiết tách ẩm trong sản phẩm. Sau đó phần nước được loại bỏ, thể tích được đo lại, sau đó được bơm vào bình phản ứng trong dụng cụ KF. Khi đến điểm cuối của chuẩn độ, các kết quả được báo cáo. Dụng cụ KF phân tích hàm lượng nước đến mức microgam. Sau đó cân đồ chứa trống và phần trăm ẩm được tính toán đối với các chất chứa trong đồ chứa ban đầu.

Phép đo nhiệt lượng quét vi sai ở nhiệt chiều cao (HT DSC) – Được sử dụng như là phương tiện để xác định sự chuyển thủy tinh của vật liệu rắn, phép đo này cung cấp thông tin hữu dụng để đánh giá chế phẩm và đánh giá thuộc tính trong trạng thái khô. HT DSC tiếp theo USP<891> hiện tại, sự phân tích nhiệt và được thực hiện sử dụng chương trình Perkin Elmer DSC 7 kết nối với bộ điều khiển TAC 7/7 Instrument Controller. Phép phân tích tham số và dữ liệu thử nghiệm được tiến hành sử dụng phần mềm PYRIS phiên bản 4.0 trên giao diện máy tính. Khoảng 10-15mg vật liệu rắn được đặt trong đĩa mẫu bằng nhôm với nắp thông hơi được rạch khía. Nitơ, NF được sử dụng để làm sạch mẫu liên tục ở tốc độ thổi là 20 ml/phút. Vật liệu đông khô được làm ẩm để nâng thuộc tính nhiệt ở các nhiệt chiều cao. Trong khi làm ẩm, sự phát nhiệt hoặc hấp thu nhiệt từ mẫu phản ánh sự chênh lệch năng lượng do mẫu trải qua xử lý nhiệt. Dữ liệu quét được ghi lại và đồng thời dựng đồ thị sử dụng phần mềm Pyris® 4.0. Các tính toán chỉ ra nhiệt độ khi bắt đầu và cao nhất khi xử lý nhiệt ngay khi hoàn tất quét. Dựa vào các kết quả quét, các nhiệt độ của sự kiện nhiệt là nhiệt độ chuyển tiếp thủy tinh (glass transition (Tg)), nhiệt độ kết tinh, điểm sôi (Tm), và kết hợp với nhiệt nóng chảy, và/hoặc nhiệt cụ thể của sản phẩm đã khô được xác định sử dụng phương pháp này.

Kết quả:

Các giá trị độ ẩm còn lại trung bình của các mẫu đông khô của chế phẩm I là gần 0%. Thời gian khô phục trung bình là từ 8 đến 10 giây. Việc quét DSC ở nhiệt chiều cao được thực hiện trên vật liệu, ở tốc độ 2°C mỗi phút, chỉ ra rằng đỉnh hấp thụ nhiệt đáng kể nhất quán quan sát được là nhiệt độ nằm trong khoảng từ $49,0^{\circ}\text{C}$ đến $51,0^{\circ}\text{C}$.

Trong khi sáng chế đã được mô tả chi tiết và dựa vào các ví dụ cụ thể, rõ ràng là đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này thì các thay đổi và sửa đổi khác nhau có thể được thực hiện mà không vượt ra khỏi phạm vi và tinh thần của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tạo ra chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô có sự nổi lên của bánh đông khô được giảm hoặc loại bỏ trong quy trình, quy trình này bao gồm các bước:

cấp vào buồng đông khô hỗn hợp tiền đông khô bao gồm dipalmitoyl phosphatidylcolin (DPPC), palmitoyloleoyl phosphatidylglycerol (POPG), axit palmitic và peptit tổng hợp có mã nhận dạng trình tự số 1 (SEQ ID NO:1) (polypeptit KL4) được phân tán trong dung môi chứa dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 3% (thể tích/thể tích) đến 20% (thể tích/thể tích) tổng thể tích của hỗn hợp tiền đông khô với phần còn lại là nước và/hoặc chất đệm, trong đó hỗn hợp tiền đông khô được chứa đầy trong đồ chứa;

hạ nhiệt độ bên trong buồng đông khô xuống để bắt đầu lạnh và hóa rắn hỗn hợp tiền đông khô ở giai đoạn đóng băng trong đó giai đoạn đóng băng bao gồm việc làm lạnh hỗn hợp tiền đông khô đến nhiệt độ thứ nhất là -45°C hoặc dưới -45°C ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến $1,0^{\circ}\text{C/phút}$ và giữ hỗn hợp tiền đông khô ở nhiệt độ thứ nhất trong khoảng thời gian thứ nhất đủ để hóa rắn ít nhất 76% dung môi để tạo ra hỗn hợp hóa rắn thứ nhất;

tiến hành giai đoạn ủ trước giai đoạn sấy sơ cấp và nhờ đó làm giảm hoặc loại bỏ sự nổi lên của bánh đông khô của hỗn hợp hóa rắn thứ nhất và trong chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô, trong đó giai đoạn ủ bao gồm (i) gia nhiệt hỗn hợp hóa rắn thứ nhất đến nhiệt độ thứ hai được chọn để làm giảm hoặc loại bỏ sự nổi lên của hỗn hợp hóa rắn thứ nhất, (ii) giữ hỗn hợp hóa rắn thứ nhất ở nhiệt độ thứ hai trong khoảng thời gian thứ hai đủ để làm giảm hoặc loại bỏ sự nổi lên của hỗn hợp hóa rắn thứ nhất, và (iii) làm lạnh hỗn hợp hóa rắn thứ nhất đến nhiệt độ thứ ba là -45°C hoặc dưới -45°C ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến $1,0^{\circ}\text{C/phút}$ để tạo ra hỗn hợp hóa rắn thứ hai, trong đó hỗn hợp hóa rắn thứ hai được giữ ở nhiệt độ thứ ba trong khoảng thời gian thứ ba đủ để thúc đẩy sự phân tách của dung môi hữu cơ không đóng băng ra khỏi hỗn hợp hóa rắn thứ hai và nhờ đó đạt được sự di chuyển của dung môi hữu cơ không đóng băng đến bề mặt tiếp xúc giữa đồ chứa và hỗn hợp hóa rắn thứ hai;

tiến hành giai đoạn sấy sơ cấp ở áp suất giảm là 30mT hoặc cao hơn, trong đó hỗn hợp hóa rắn thứ hai được giữ ở nhiệt độ thứ tư trong khoảng thời gian thứ tư đủ để loại bỏ ít nhất 5% dung môi hữu cơ, sau đó gia nhiệt đến nhiệt độ thứ tư đủ để giữ hỗn hợp hóa rắn thứ hai không bị nổi lên trong đồ chứa và duy trì kết cấu được thiết lập trong suốt giai đoạn ủ, và tiếp tục được giữ ở nhiệt độ thứ tư trong khoảng thời gian thứ năm đủ để loại bỏ ít nhất 70% dung môi và nhờ đó tạo ra hỗn hợp hóa rắn thứ ba; và

tiến hành giai đoạn sấy thứ cấp ở áp suất giảm trong khoảng thời gian thứ sáu đủ để tạo ra chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô có hàm lượng dung môi còn lại nhiều nhất là 2%; trong đó chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô có diện tích bề mặt riêng ít nhất là 2,2 m²/g.

2. Quy trình theo điểm 1, trong đó tỷ lệ thể tích của hỗn hợp tiền đông khô trong đồ chứa so với thể tích đồ chứa nằm trong khoảng từ 28% đến 68%.
3. Quy trình theo điểm 1, trong đó tỷ lệ chiều cao của hỗn hợp tiền đông khô trong đồ chứa so với đường kính đồ chứa nằm trong khoảng từ 0,3 đến 0,8.
4. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuẩn bị hỗn hợp tiền đông khô trong đó dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 3% đến 15%.
5. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuẩn bị hỗn hợp tiền đông khô trong đó dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 5% đến 10%.
6. Quy trình theo điểm 1, trong đó quy trình này còn bao gồm bước chuẩn bị hỗn hợp tiền đông khô trong đó dung môi hữu cơ nằm trong khoảng từ 7% đến 10%.
7. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

tiến hành giai đoạn đóng băng, trong đó hỗn hợp tiền đông khô được làm lạnh đến nhiệt độ thứ nhất là $-50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1,0°C/phút;

tiến hành giai đoạn ủ, trong đó hỗn hợp hóa rắn thứ nhất được (i) gia nhiệt đến nhiệt độ thứ hai là $-22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1,0°C/phút, (ii) giữ ở nhiệt độ thứ hai trong khoảng thời gian thứ hai từ 3 đến 8 giờ, (iii) làm lạnh đến nhiệt độ

thứ ba là $-50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ở tốc độ nằm trong khoảng từ 0,1 đến $1,0^{\circ}\text{C}/\text{phút}$; và (iv) giữ ở nhiệt độ thứ ba trong khoảng thời gian thứ ba từ 3 đến 8 giờ; và

tiến hành giai đoạn sấy sơ cấp ở áp suất được chọn nằm trong khoảng từ 30mT đến 200mT và nhiệt độ sấy sơ cấp được chọn nằm trong khoảng từ -25°C đến 0°C được ủ từ nhiệt độ $-50^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, và tiếp tục được giữ ở giai đoạn sấy sơ cấp trong thời gian ít nhất là 10 giờ.

8. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó quy trình này còn bao gồm bước tiến hành giai đoạn sấy thứ cấp ở áp suất được chọn nằm trong khoảng từ 30mT đến 200mT và nhiệt độ tối đa là $46^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

9. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó diện tích bề mặt riêng nằm trong khoảng từ $2,2 \text{ m}^2/\text{g}$ đến $3,7 \text{ m}^2/\text{g}$.

10. Quy trình theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô có độ xốp trên 40% thể tích của tổng diện tích của chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô.

11. Chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô bao gồm:

polypeptit tổng hợp có mã nhận dạng trình tự số 1 (SEQ ID NO:1) (polypeptit KL4), dipalmitoyl phosphatidylcholin (DPPC), palmitoylloleoyl phosphatidylglycerol (POPG) và

axit palmitic, trong đó chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô có diện tích bề mặt riêng ít nhất là $2,2 \text{ m}^2/\text{g}$.

12. Chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô theo điểm 11, trong đó diện tích bề mặt riêng nằm trong khoảng từ $2,2 \text{ m}^2/\text{g}$ đến $3,7 \text{ m}^2/\text{g}$.

13. Chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô theo điểm 11, trong đó chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô có độ xốp trên 40% thể tích của tổng diện tích của chất hoạt động bề mặt trong phổi tổng hợp dạng đông khô.

FIG. 1

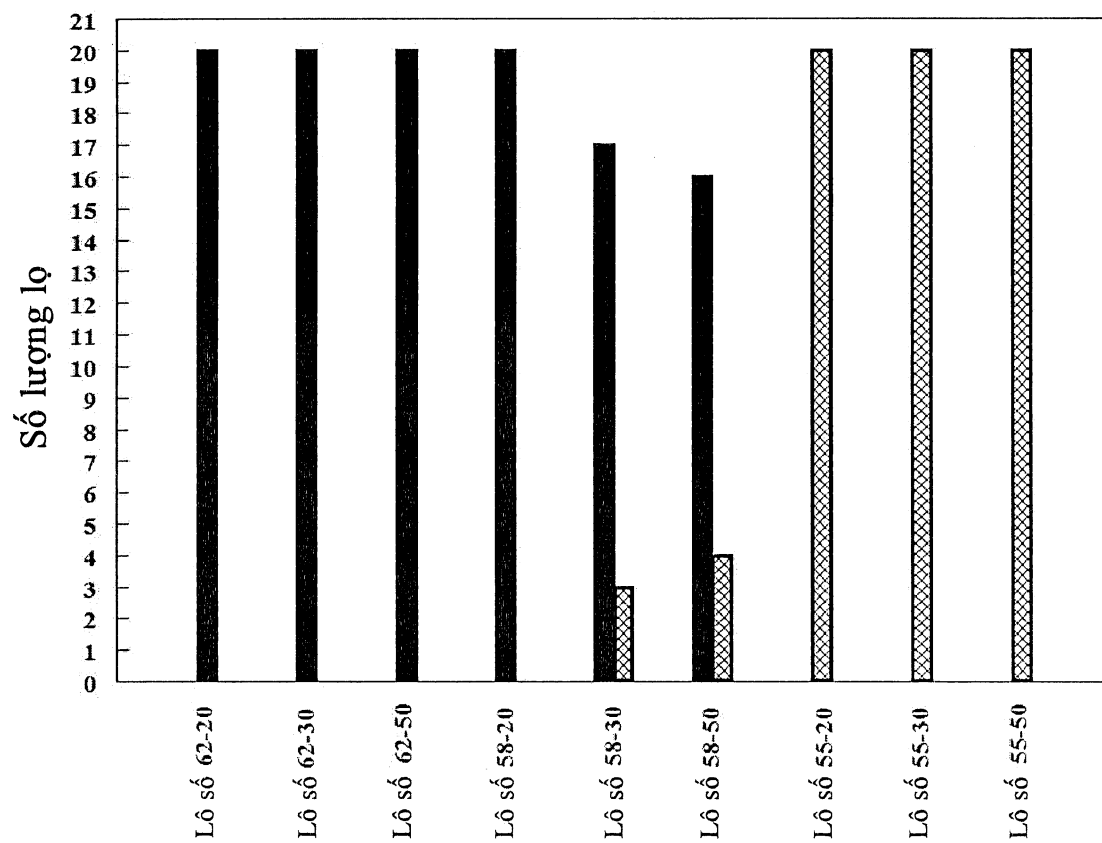
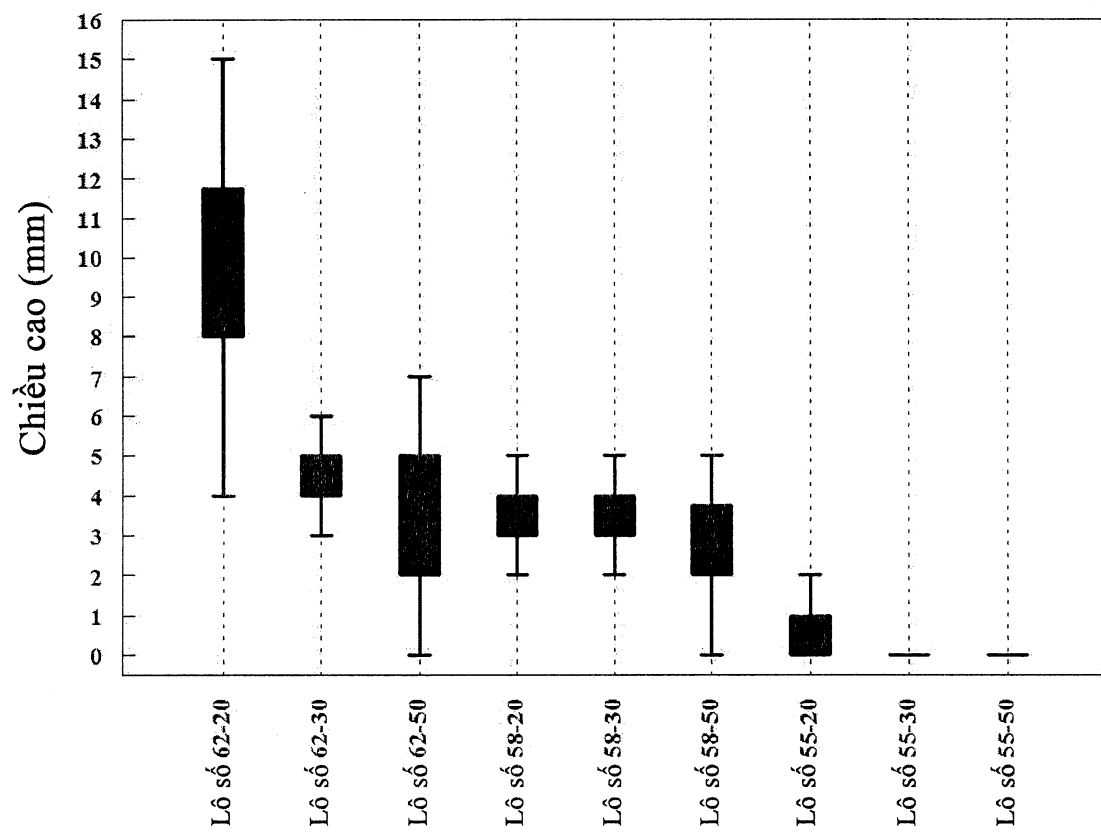


FIG. 2



20615

3/6

FIG. 3A

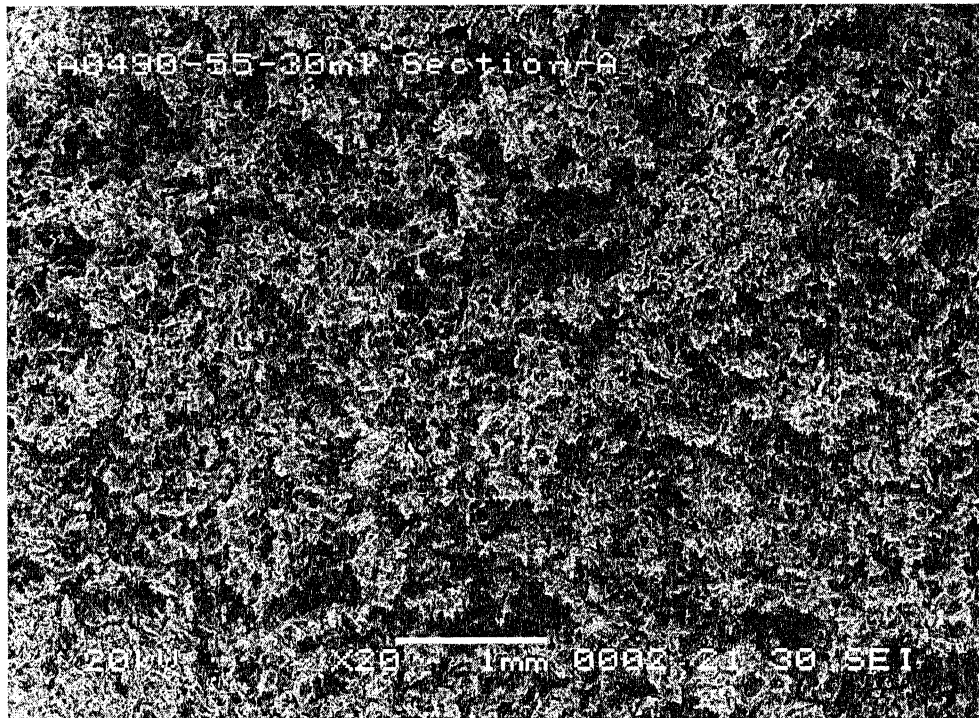
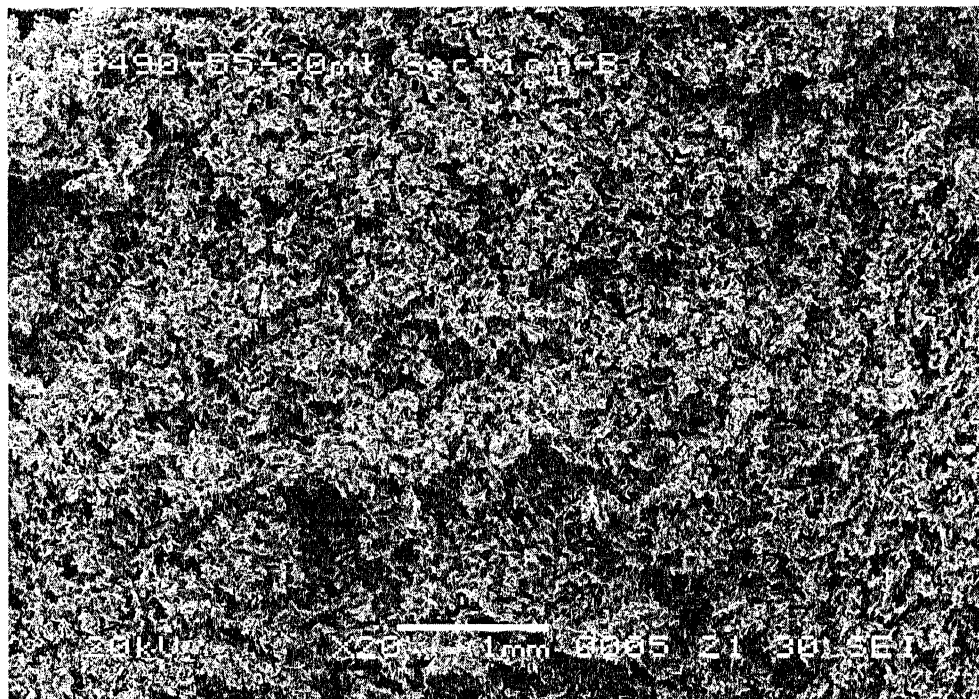


FIG. 3B



20615

4/6

FIG. 4A

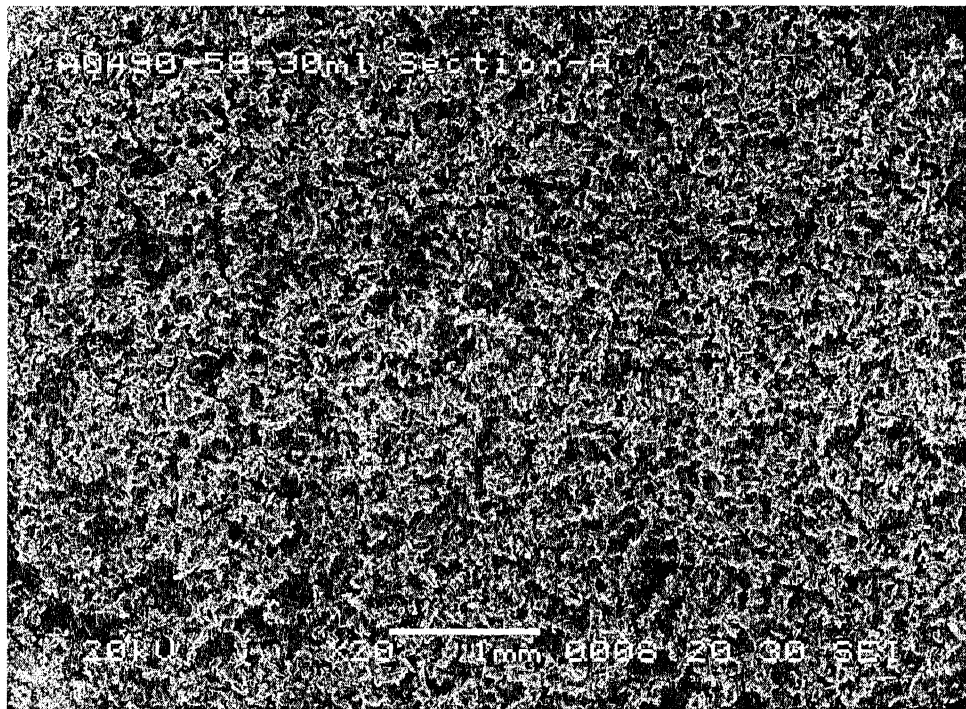


FIG. 4B

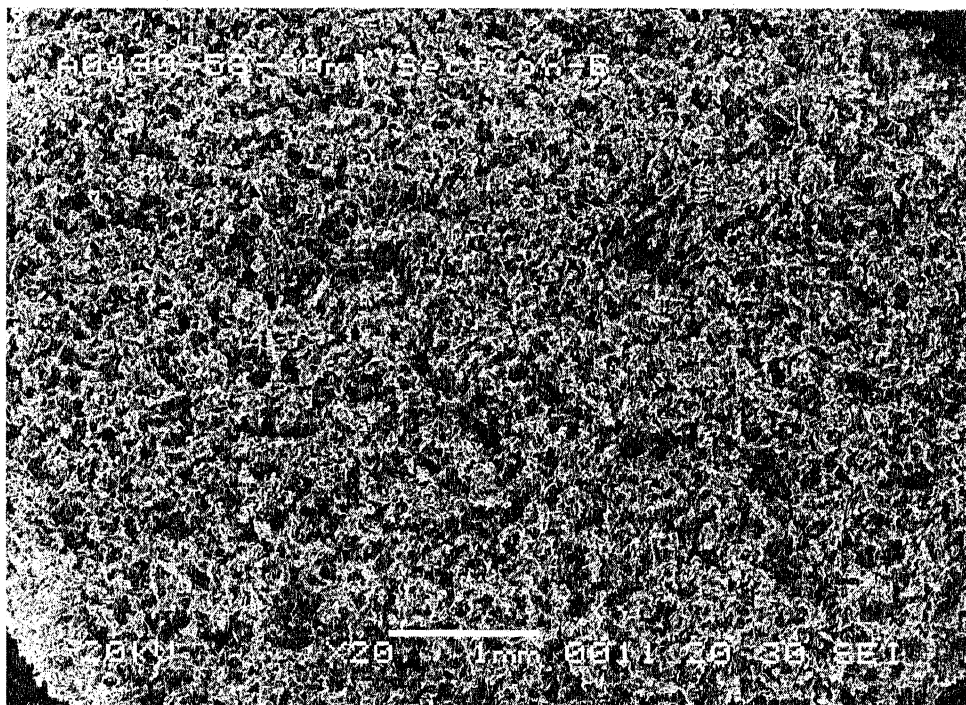


FIG. 5A

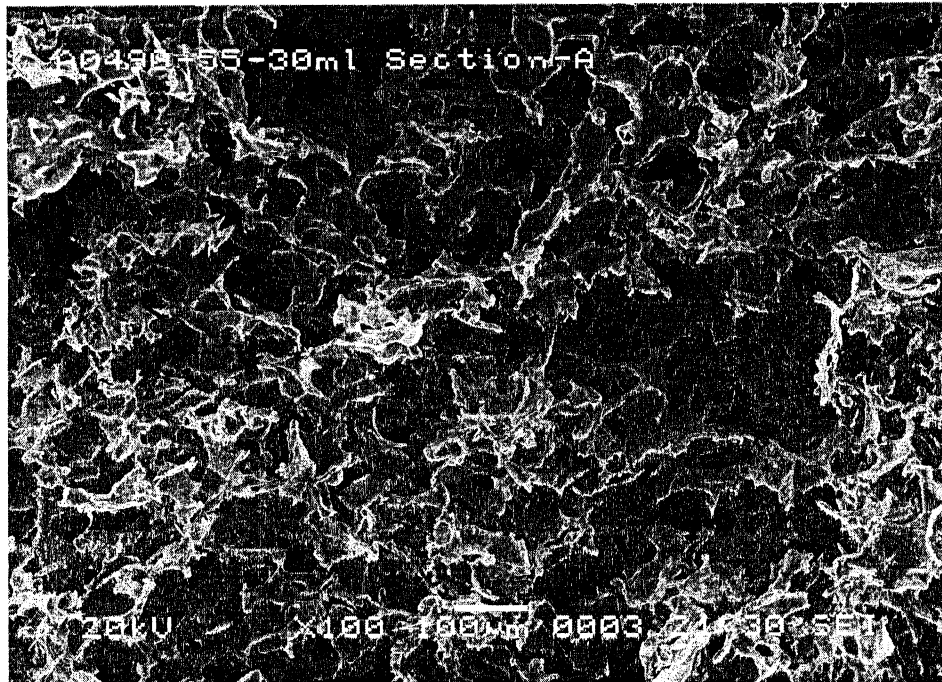
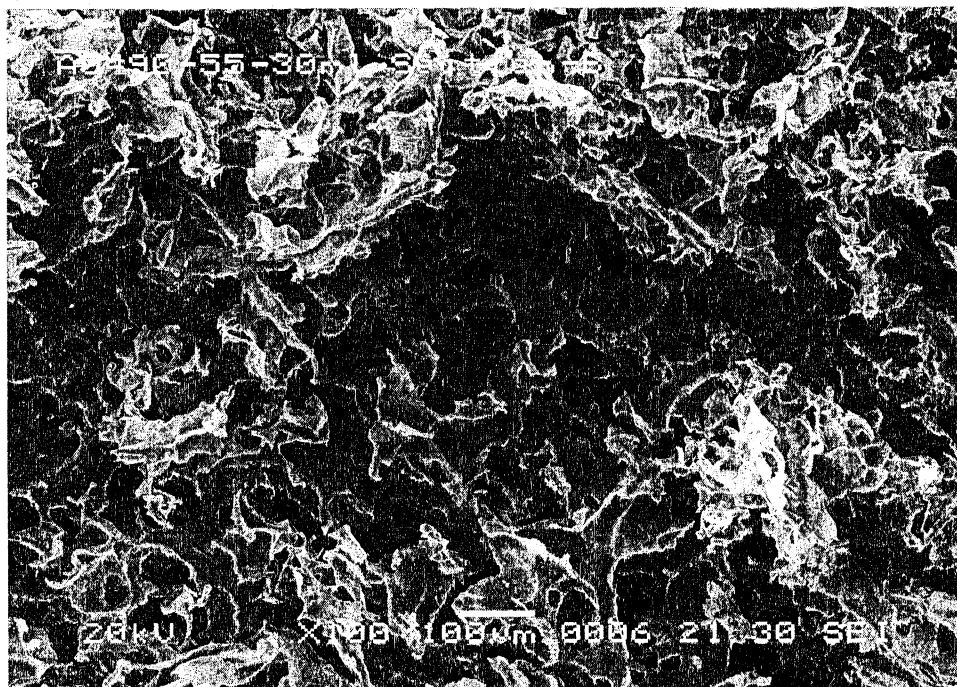


FIG. 5B



20615

6/6

FIG. 6A

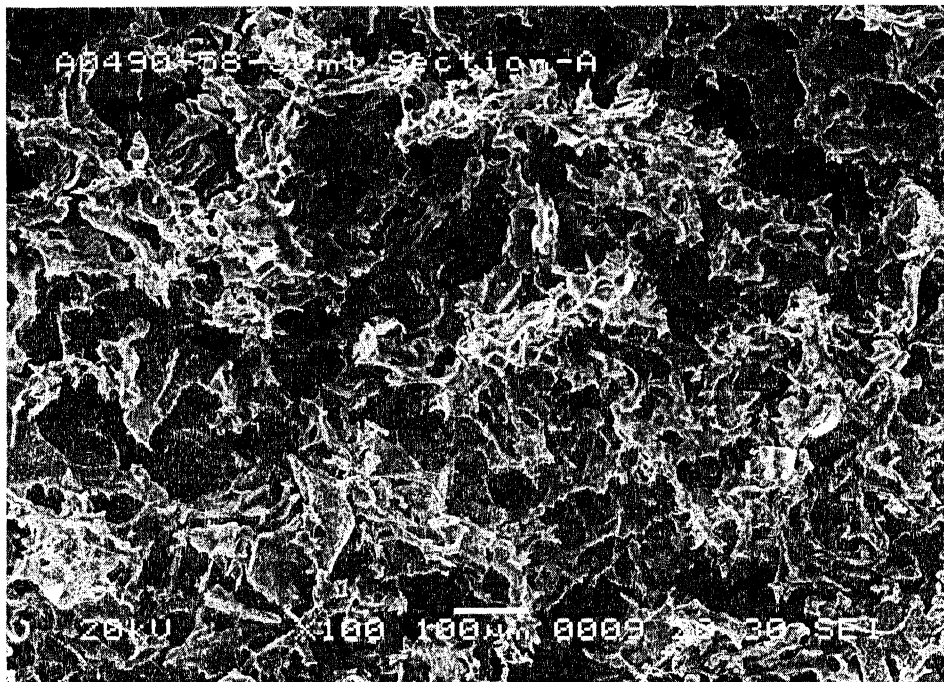


FIG. 6B

